

Fernanda Tridapalli Fóes Linhares

**ASPECTOS TAXONÔMICOS E FILOGENÉTICOS DE
Gloeocantharellus SINGER (GOMPHALES, BASIDIOMYCOTA)**

Trabalho de Conclusão de Curso
submetido ao Curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do
Grau de bacharel e licenciado em
Ciências Biológicas

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Alice
Neves

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Linhares, Fernanda Tridapalli Fôes
Aspectos taxonômicos e filogenéticos de
Gloeocantharellus Singer (Gomphales, Basidiomycota) /
Fernanda Tridapalli Fôes Linhares ; orientadora, Maria
Alice Neves - Florianópolis, SC, 2015.
87 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. Fungos. 3. Taxonomia. 4.
Filogenia molecular. I. Neves, Maria Alice. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Ciências Biológicas. III. Título.

Fernanda Tridapalli Fóes Linhares

**ASPECTOS TAXONÔMICOS E FILOGENÉTICOS DE
Gloeocantharellus SINGER (GOMPHALES, BASIDIOMYCOTA)**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de bacharel e licenciado em Ciências Biológicas, e aprovado em sua forma final pelo Centro de Ciências de Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 10 de julho de 2015.

Prof.^a Maria Risoleta Freire Marques, Dr.^a
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:



Prof.^a Dr. Elisandro Ricardo Drechsler dos Santos
Universidade Federal de Santa Catarina



Prof. Dr. Admir José Giachini
Universidade Federal de Santa Catarina, MIP



Ms. Altielys Casale Magnago
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas foram essenciais não só na realização deste trabalho mas também na minha formação como Bióloga.

Eu agradeço, primeiramente, os meus pais e os meus avós por terem me apoiado de todas as formas possíveis para que eu pudesse ter uma formação plena e proveitosa na Biologia.

Durante o curso, eu tive a oportunidade de ter aula com grandes profissionais que aguçaram a minha paixão e fascínio pela Biologia. Uns me mostraram o quanto a biologia pode ser incrível, outros me abriram os olhos para esta profissão linda e ao mesmo tempo desafiadora que é a de ser educador. Porém todos contribuíram de alguma forma para o meu crescimento pessoal. Paulinho, Renato, Paulo Hoffmann, Marg, Neide, Arthur, obrigada pelo carinho e por todo o conhecimento e experiência compartilhados.

Um obrigado mais do que especial para aquele que estive do meu lado, nas conquistas e nas crises, desde as primeiras fases da bio, e que foi o responsável por grande parte do meu amadurecimento e aprendizado dentro e fora do curso. Meu companheiro, meu amor, meu anjo, te amo muito fê.

Agradeço a minha companheira de todas as horas, a minha confidente, minha cara-metade, má linda. Obrigada por me apoiar e me entender em todos os momentos e por ser a melhor amiga que alguém pode ter.

Aos grandes amigos que fiz na Biologia, especialmente às minhas flores, que trilharam esse caminho junto comigo e com as quais vivenciei momentos incríveis. Jungle, Jú, Malu, Aninha, Sá, Mary, Dri, Ari e Jé, vocês iluminam os meus dias, cada uma do seu jeito, e hoje vocês já são parte da minha vida (mesmo longe), obrigada por tudo.

Tenho muito a agradecer à família Micolab, os que já seguiram as suas vidas mas que sempre farão parte da família e os que recém entraram. Vocês fazem os meus dias mais alegres e a rotina de trabalho e pesquisa mais tranquila. Obrigada por todo o apoio, pela parceria nas horas intermináveis na microscopia e na molecular, pelas coletas, viagens, papos, cafés, cervejas e por tudo que vocês me ensinaram e compartilharam. Um beijo especial pra Meli, Alti e Caio, que mais do que companheiros no lab tornaram-se grandes amigos pra vida. Agradeço especialmente ao Mateus por ter me orientado e me ensinado muito nesses últimos meses e por me tranquilizar nos momentos de desespero. Grande parte deste trabalho não seria possível se não fosse por ele.

Agradeço ao povo do LCME – UFSC por terem possibilitado uma parte muito importante do meu trabalho que foram as análises de varredura dos esporos.

Ao grande micólogo Pablo Daniels, com o qual eu aprendi muito sobre esse grupo de fungos eu agradeço por, mesmo longe, estar sempre disponível para ajudar.

E finalmente mas não menos importante, agradeço imensamente à minha orientadora que me abriu as portas para esse mundo maravilhoso da micologia. Maria, tu sempre foi um exemplo de pessoa, educadora e pesquisadora pra mim e saiba que tu é a maior responsável pela realização desse trabalho. Obrigada por esses 5 anos de companherismo e muito aprendizado e por ser essa pessoa maravilhosa.

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos.”

(Marcel Proust)

RESUMO

Os fungos são organismos primordiais nos processos de decomposição e ciclagem de nutrientes na natureza, além de participarem de uma série de relações ecológicas com outros seres. Porém, estimativas apontam que o conhecimento acerca da diversidade destes seres ainda é escasso. Dentre os basidiomicetes, a ordem Gomphales engloba táxons com uma ampla variedade morfológica de basidiomas, hábitos, himenóforos e características microscópicas. *Gloeocantharellus* é um gênero caracterizado por apresentar basidiomas robustos, lamelas decurrentes, basidiósporos ornamentados e cianofílicos, gloeocistídios e hifas gloeopleuras. O gênero apresenta 11 espécies aceitas e possui distribuição anfipacífica. Apesar de ser bem delimitado morfológicamente, nenhuma análise filogenética com enfoque no gênero foi realizada até o momento. Com o objetivo de contribuir para o conhecimento de *Gloeocantharellus* e suas relações filogenéticas interespecíficas foram estudados espécimes coletados em áreas de Mata Atlântica e coleções de herbários, através de análises morfológicas, ultraestruturais e moleculares. Doze espécimes foram analisados morfológicamente, dos quais quatro foram coletados durante o trabalho e sete são coleções de herbários, com um total de sete espécies identificadas. Foram identificadas três táxons novos e o terceiro registro de *G. corneri* para o Brasil. Para todos os táxons estudados são apresentadas descrições morfológicas, fotografias dos basidiomas, ilustrações dos principais caracteres micromorfológicos e fotografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos basidiósporos. Por fim, é apresentada uma filogenia (*atp6* e ITS) que indica a monofilia do gênero e relações filogenéticas entre algumas espécies. A partir dos resultados obtidos foi possível observar a importância da análise conjunta de dados morfológicos, ultraestruturais, moleculares e de distribuição, sendo a ornamentação dos esporos um elemento crucial em estudos envolvendo o gênero.

Palavras-chave: Basidiomycetes. Taxonomia. Filogenia molecular.

ABSTRACT

Fungi are primordial organisms in the decomposition and nutrient cycling processes in nature, as well as participate in many ecological relationships with other beings. However, estimates suggest that knowledge about the fungi diversity is scarce. Among basidiomycetes, the order Gomphales includes taxa with wide morphological variety of basidiomes, habits, hymenophores and microscopic characteristics. *Gloeocantharellus* is characterized by presenting fleshy basidiomes, decurrent lamellae, ornamented and cyanophilic basidiospores, gloeocistidia and gloeoplerous hyphae. The genus includes 11 accepted species and has anipacific distribution. Despite its well morphological circumscription, there are no phylogenetic studies focusing on the genus. Aiming to contribute to the knowledge of *Gloeocantharellus* and their interspecific phylogenetic relationships, specimens collected in the Atlantic Forest areas and collections of herbaria were studied by morphological, ultrastructural and molecular analysis. Twelve specimens were morphologically analyzed, of which four were collected during this work and seven were collections of herbaria, with seven taxa identified. Here we presented three new species and a third record of *G. corneri* to Brazil. The morphological descriptions, photographs of the basidiomes, illustrations of the main micromorphologic characters, and Scanning Electron Microscopy (SEM) of the basidiospores are presented for each species. Finally, it is presented a phylogeny (*atp6* and ITS) that indicates the monophyly of the genus and phylogenetic relationships among some species. Considering the results presented, it is possible to observe the importance of the the joint analysis of morphological, ultrastructural, molecular and distribution data, with the basidiospores ornamentation a crucial element in studies involving the genus.

Keywords: Basidiomycetes. Taxonomy. Molecular phylogeny.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árvore filogenética representada por *Gloeocantharellus* e outros gêneros de Gomphales, gerada a partir do marcador *atp6*, com a topologia baseada na análise de Inferência Bayesiana. Os números nos ramos representam os valores de BS / valores de PP. O ramo destacado em negrito indica o ramo que origina o clado *Gloeocantharellus*. Os espécimes destacados em negrito representam os materiais coletados durante este trabalho..... 41

Figura 2. Árvore filogenética representada por espécies de *Gloeocantharellus*, gerada a partir do marcador ITS, com a topologia baseada na análise de Inferência Bayesiana. Os números nos ramos representam os valores de BS / valores de PP. Os espécimes destacados em negrito representam os materiais coletados durante este trabalho... 43

Figura 3. Basidiomas em campo dos espécimes de *Gloeocantharellus* coletados durante o período do trabalho. **A:** *Gloeocantharellus* cf. *corneri*; **B:** *Gloeocantharellus* aff. *echinosporus*; **C:** *Gloeocantharellus* sp. 1; **D:** *Gloeocantharellus* sp. 2. Escala = 2,5 cm. 63

Figura 4. Fotos em MEV dos basidiósporos de *Gloeocantharellus*. **A:** *Gloeocantharellus* cf. *corneri*; **B:** *Gloeocantharellus* aff. *echinosporus*; **C:** *Gloeocantharellus* sp.1; **D:** *Gloeocantharellus* sp.2; **E:** *G. echinosporus*; **F:** *G. lateritius*; **G:** *G. okapaensis*. 64

Figura 5. Caracteres micromorfológicos de *Gloeocantharellus* cf. *corneri*. **A:** Basidiósporos; **B:** Basídios; **C:** Gloeocistídios; **D:** Estipitipellis; **E:** Pileipellis. Escala: 10µm..... 65

Figura 6. Caracteres micromorfológicos de *Gloeocantharellus* aff. *echinosporus*. **A:** Basidiósporos; **B:** Basídios; **C:** Gloeocistídios; **D:** Cistídios himeniais; **E:** Pileipellis; **F:** Estipitipellis. Escala: 10µm. 66

Figura 7. Caracteres micromorfológicos de *Gloeocantharellus* sp. 1. **A:** Basidiósporos; **B:** Cistídios himeniais **C:** Basídios; **D:** Estipitipellis. Escala: 10µm..... 67

Figura 8. Caracteres micromorfológicos de *Gloeocantharellus* sp. 2. **A:** Basidiósporos; **B:** Basídios; **C:** Cistídio himenial; **D:** Trama do píleo; **E:** Pileipellis. Escala: 10µm..... 68

Figura 9. Caracteres micromorfológicos de *Gloeocantharellus echinosporus*. **A:** Basidiósporos; **B:** Estipitipellis; **C:** Pileipellis. Escala: 10µm. 69

Figura 10. Caracteres micromorfológicos de *Gloeocantharellus lateritius*. **A:** Basidiósporos; **B:** Pileipellis. Escala: 10µm..... 70

Figura 11. Caracteres micromorfológicos de *Gloeocantharellus okapaensis*. **A:** Basidiósporos; **B:** Gloeocistídios; **C:** Pileipellis; **D:** Estipitipellis. Escala: 10µm..... 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies de <i>Gloeocantharellus</i> registradas para o mundo	27
Tabela 2: Protocolos dos termociclos utilizados nas reações de PCR para cada região do DNA.....	34
Tabela 3: Localidades das coletas realizadas durante o trabalho	36
Tabela 4: Espécimes estudados durante o período do trabalho	37

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CGE – Cambridge University Herbarium
K – Kew, Royal Botanic Gardens
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
Rebio – Reserva Biológica

cm – centímetro
comp. – comprimento
diam. – diâmetro
h – hora
Kev – mil elétrons-volt
M – molar
mg – miligrama
min – minuto
mL – mililitro
mm – milímetro
mM – milimolar
 μ L – microlitro
 μ m – micrômetro
nm – nanômetro
rpm – rotações por minuto
s – segundo
v – volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 OS FUNGOS E A ORDEM GOMPHALES	21
1.2 HISTÓRICO E CLASSIFICAÇÃO DE <i>GLOEOCANTHARELLUS</i>	23
1.3 MORFOLOGIA DO GÊNERO	24
1.3.1 Basidioma	24
1.3.2 Píleo	25
1.3.3 Himenóforo	25
1.3.4 Basidiósporos	25
1.3.5 Gloeocistídios	25
1.3.6 Hifas gloeopleuras	26
1.3.7 Pellis	26
1.3.8 Reação macroquímica	26
1.4 DISTRIBUIÇÃO NO MUNDO E NO BRASIL	26
1.5 ESTUDOS FILOGENÉTICOS MOLECULARES	28
1.6 JUSTIFICATIVA	29
2 OBJETIVOS.....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 COLETAS E PROCEDIMENTOS EM LABORATÓRIO	31
3.2 COLEÇÕES EXAMINADAS	32
3.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 ANÁLISES FILOGENÉTICAS MOLECULARES	37
4.2 TAXONOMIA	41
4.3 DISCUSSÃO GERAL	72
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
REFERÊNCIAS	78
ANEXO A – ISOLAMENTO DE DNA TOTAL DE PLANTAS UTILIZANDO-SE O MÉTODO CTAB DE ROMANO & BRASILEIRO (1998) ADAPTADO PARA FUNGOS	84
ANEXO B – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO UTILIZANDO O KIT DNA MAGNEX (ADAPTADO DO ORIGINAL)	86
ANEXO C – PROTOCOLO DE PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR COM PEG	87

1 INTRODUÇÃO

1.1 OS FUNGOS E A ORDEM GOMPHALES

O reino *Fungi* é composto por organismos extremamente importantes e abundantes na natureza. Seu papel como decompositores de matéria orgânica faz deles seres primordiais na ciclagem de nutrientes, moldando diretamente a dinâmica dos ecossistemas florestais e possibilitando a manutenção da vida na Terra. A fase somática destes organismos, chamada de micélio, é abundante e está presente em diferentes substratos, servindo como uma fonte de carbono primária em muitas cadeias alimentares. As estruturas reprodutivas de vários macrofungos servem de fonte alimentar para muitos vertebrados, incluindo humanos (Peay et al. 2008).

A evolução dos fungos permitiu que eles se adaptassem a diferentes nichos, de modo a crescer e se desenvolver em quase todos os habitats na Terra, com diversas funções ecológicas, e a interagir com uma ampla variedade de organismos de todos os grandes grupos de seres vivos (Blackwell 2011). A associação micorrízica, simbiose entre raízes de plantas e fungos, é um dos mutualismos mais onipresentes nos ecossistemas terrestres, da qual muitas plantas dependem para a sua nutrição e sobrevivência (Peay et al. 2008). Além desta, outras interações como simbiose com algas e cianobactérias (líquens), parasitismo de plantas, insetos, vertebrados e até outros fungos também estão entre as estratégias de vida dos organismos do reino *Fungi*. Além do seu papel ecológico central, os fungos também possuem uma grande importância econômica em diversos setores, como o agrícola, medicinal, biotecnológico e alimentício.

Ainda assim, estudos apontam que as quase 100.000 espécies de fungos conhecidas pela ciência (Kirk et al. 2008) atualmente correspondem a menos de 10% da real diversidade, estimada entre 1,5 (Hawksworth 2001) e 5,1 milhões de espécies (Blackwell 2011), demonstrando que, apesar do reconhecimento da importância dos fungos, pouco se conhece acerca da diversidade. Esta imensa lacuna entre a diversidade conhecida e a estimada levou diversos autores a sugerirem que todos estes fungos ainda desconhecidos pela ciência encontram-se em florestas tropicais, muitas das quais continuam inexploradas e possuem alto potencial de riqueza de fungos. Além disso, autores também discutem a possibilidade da presença de diferentes fungos em certos habitats pouco investigados, como musgos, plantas

marinhas, algas, rochas, solo, resíduos vegetais e rúmen de mamíferos herbívoros (Hawksworth & Rossman 1997; Hawksworth 2001; Mueller & Schmit 2007).

Dentro do reino *Fungi*, o filo Basidiomycota R.T. Moore inclui táxons que desenvolvem estruturas macroscópicas (basidiomas) formadas por estruturas microscópicas, ambas com uma ampla variação morfológica entre os táxons, responsáveis pela sua reprodução sexuada.

A inclusão de dados moleculares oriundos de sequências de regiões informativas do DNA nos estudos sistemáticos de fungos, a partir dos anos 90 (White et al. 1990), permitiu o avanço do conhecimento acerca da diversidade e das relações filogenéticas dos basidiomicetes. O progresso dos estudos filogenéticos moleculares acarretou uma mudança na forma de se pensar a taxonomia destes seres, bem como colocou à prova ideias e teorias arraigadas pelo sistema de classificação tradicional, baseadas principalmente numa abordagem morfológica. Tradicionalmente, táxons elevados de basidiomicetes eram agrupados de acordo com a morfologia dos seus basidiomas (Hibbett 2004). Atualmente, a partir do uso de ferramentas moleculares, se sabe que o formato do basidioma destes fungos, seja ele agaricoide, poliporoide, gasteroide ou coraloide, ou ainda o padrão do seu himenóforo, seja liso, odontoide, lamelar ou poroide, são indicadores de relações evolutivas muito menos informativos do que outros caracteres, como os tipos de sistema hifal e a natureza dos basidiósporos (Hawksworth 2006). Isto porque são caracteres sujeitos à convergência evolutiva, que surgiram diversas vezes na história evolutiva dos diferentes grupos (Hibbett 2004).

A ordem Gomphales Jülich engloba táxons com uma ampla diversidade macromorfológica, incluindo espécies com hábito epígeo ou hipógeo, com basidiomas coraloides, clavarioides, cantarelóide-gonfóides, agaricoides, ressupinados, odontóides e falsas trufas. Porém, apesar desta variabilidade, são táxons posicionados na ordem por compartilharem algumas características microscópicas e macroquímicas, como esporos com ornamentação cianofílica, basídios quiásticos, construção hifal semelhante e reação himenial positiva a sais férricos (Hosaka et al. 2006; Hibbett et al. 2014). Giachini et al. (2010), a partir de análises filogenéticas moleculares, indicam a morfologia ramarioide como ancestral para Gomphales, com múltiplas derivações independentes das diferentes morfologias do basidioma presentes entre os táxons da ordem. Os autores também afirmam que a presença de fíbulas é um carácter ancestral na ordem, com várias perdas da condição

fibulada na evolução do grupo. Os membros de Gomphales também apresentam variação na afinidade por substrato. Muitas espécies são sapróbias, desenvolvendo-se sobre a madeira, outras são consideradas ectomicorrízicas, apesar do *status* desta condição em muitas espécies ainda ser desconhecido (Hosaka et al. 2006).

1.2 HISTÓRICO E CLASSIFICAÇÃO DE *GLOEOCANTHARELLUS*

Gloeocantharellus foi proposto por Singer (1945) ao revisar o holótipo de *Cantharellus purpurascens* Hesler e relatar a presença de gloeocistídios, basidiósporos verrucosos e lamelas com uma rede de veias concêntricas, características nunca relatadas em *Cantharellus* Adans. ex Fr. até então, elencando *Gloeocantharellus purpurascens* (Hesler) Singer como a espécie-tipo do gênero. Além disso, Singer também caracterizou o gênero pela presença de esporos inamiloides, hifas fibuladas com parede fina, e basídios moderadamente longos e tetraesterigmados. Singer considerou *Gloeocantharellus* como um gênero morfológicamente intermediário entre *Cantharellus* e *Gomphus* Pers., por possuir características morfológicas de ambos os gêneros.

Independentemente, dois anos após, Singer propôs o gênero *Linderomyces* ao revisar o holótipo de *Paxillus lateritius* Petch, coletado no Sri Lanka, pela presença de um sistema hifal único, desconhecido até então, com estruturas de aspecto esponjoso as quais ele denominou coscinoides e coscinocistídios (Singer 1947). Singer (1961) apresentou o segundo registro de *Linderomyces* ao relatar a presença destas mesmas estruturas no sistema hifal de um espécime coletado por Corner, em 1948, na cidade do Rio de Janeiro, concluindo ainda que aquela correspondia a uma nova espécie a qual ele denominou *L. corneri* Singer. Petersen (1968) e Corner (1969) afirmaram, contudo, que os elementos coscinoides citados por Singer (1947) foram mal interpretados por ele a partir do material desidratado e que, na verdade, eram gloeocistídios e hifas gloeopleuras idênticos aos de *Gloeocantharellus*, colocando *Linderomyces* em sua sinonímia, já que as diferenças entre eles não eram suficientes para separá-los. Corner (1969) fez uma revisão do gênero, abordando e discutindo características morfológicas e relações filogenéticas com gêneros próximos, propondo novas combinações – *G. corneri* (Singer) Corner, *G. lateritius* (Petch) Corner e *G. okapaensis* (Corner) Corner – e uma nova espécie – *G. echinosporus* Corner. *Gloeocantharellus* foi transferido para a família Gomphaceae Donk por Donk (1964), juntando-se com *Gomphus*,

Ramaria Fr., *Kavinia* Pilát e outros gêneros, baseado em algumas características dos basidiósporos e na reação positiva do basidioma (tornando-se esverdeado) em contato com solução de sulfato férrico (Donk 1961). Julich (1981) propôs a ordem Gomphales para incluir a família Gomphaceae juntamente com Beenakiaceae Julich, Lentariaceae Julich e Ramariaceae Corner. Esta classificação foi corroborada por Villegas *et al.* (1999), os quais propuseram uma filogenia de Gomphaceae *s.l.* através de métodos cladísticos utilizando somente caracteres morfológicos e concluíram que a ordem Gomphales é monofilética, caracterizada por uma única sinapomorfia que é a presença de cordões miceliais. Entretanto, a partir de estudos filogenéticos moleculares, propôs-se uma nova classificação da ordem, a qual inclui as famílias Gomphaceae, Ramariaceae, Lentariaceae, Gautieriaceae Zeller, Beenakiaceae e Clavariadelphaceae Corner (Hosaka *et al.* 2006; Kirk *et al.* 2008; Giachini *et al.* 2010; Hibbett *et al.* 2014).

Atualmente, *Gloeocantharellus* é considerado um dos gêneros do grupo *Gomphus* *s.l.*, junto com *Gomphus* *s.s.*, *Phaeoclavulina* Brinkmann e *Turbinellus* Earle, pertencentes à família Gomphaceae, os quais possuem similaridades na morfologia dos esporos e na configuração do himenóforo (Giachini 2004). Contudo, *Gloeocantharellus* possui características únicas que o separa dos outros gêneros, como abundância de hifas gloeopleuras por todo o basidioma e presença variável de fíbulas (Giachini & Castellano 2011). Apesar de não haver registros de associação ectomicorrízica dentro do grupo, os basidiomas de *Gloeocantharellus* geralmente são encontrados em locais onde espécies de árvores que estabelecem relações ectomicorrízicas são comuns (Giachini 2004).

1.3 MORFOLOGIA DO GÊNERO

Gloeocantharellus engloba espécies com características morfológicas bem marcantes, várias destas taxonomicamente informativas. Algumas das características mais marcantes do gênero são discutidas a seguir.

1.3.1 Basidioma

Os basidiomas apresentam hábito agaricoide-gomphoide, com até 15 cm de comprimento, geralmente bastante robustos, podendo ser também mais delgados, como em *G. novae-zelandiae* (Segedin)

Giachini. Podem crescer solitários, gregários ou cespitosos. Em *G. corneri*, *G. echinosporus*, *G. lateritius* e *G. okapaensis* tornam-se roxo amarronzados ou avermelhados quando manuseados.

1.3.2 Píleo

O píleo dos basidiomas jovens é convexo, tornando-se plano a depresso ou infundibuliforme, com 1 a 14 cm de largura, com a superfície glabra a tomentosa, esquamulosa, ou velutínea, lisa ou fibrilosa, seca ou viscosa. A margem é inteira a subcrenada, incurvada a aplanada, podendo ser ondulada, lacerada com a maturidade em *G. dingleyae* (Segedin) Giachini. Possui uma coloração amarelo pálida, alaranjada, vermelha, marrom ou rosada.

1.3.3 Himenóforo

O himenóforo apresenta lamelas profundamente decurrentes, podendo ser verdadeiras, com dobras himeniais bifurcadas ou com dobras enrugadas. Possui coloração branca, creme, alaranjada ou marrom. Em *G. echinosporus*, rosada nos basidiomas jovens ou próximo ao píleo e ao estipe.

1.3.4 Basidiósporos

Os basidiósporos variam entre 7 a 20 μm de comprimento por 3 a 7 μm de largura, podendo ser elipsoides, obovóides a amigdaliformes, com coloração amarelada a amarronzada em massa. Possuem ornamentação verrucosa, podendo eventualmente anastomosar, a rugosa. *Gloeocantharellus echinosporus* é a única espécie com esporos com ornamentação pontiaguda, sendo equinulados. A parede geralmente é engrossada e apresenta reação cianofílica.

1.3.5 Gloeocistídios

Gloeocistídios são cistídios com formato irregular, de parede fina e com conteúdo densamente alveolado, amarelado e fortemente refringente (Larsen & Burdsall 1976; Largent et al. 1977). Originalmente, Singer (1945) propôs *Gloeocantharellus* primariamente pela presença de gloeocistídios, caracter que o nomeou. Contudo, atualmente este já não pode mais ser considerado com um caracter

diagnóstico de *Gloeocantharellus*, já que nem todas as espécies do gênero conhecidas atualmente o possuem [*G. mamorensis* (Singer) Giachini e *G. pallidus* (Yasuda) Giachini]. Quando presentes, aparecem no himênio e/ou na *pellis*.

1.3.6 Hifas gloeopleuras

Todas as espécies de *Gloeocantharellus* apresentam hifas gloeopleuras em abundância, podendo estar presentes em qualquer parte do basidioma. Elas são conspícuas e geralmente bastante sinuosas, podendo apresentar um conteúdo homogêneo ou densamente alveolado como dos gloecistídios, ambos fortemente refringentes. *Gloeocantharellus mamorensis* é a única espécie em que essas hifas não são relatadas, porém não há, até o momento, uma descrição micromorfológica detalhada do holótipo, fazendo-se necessária uma cuidadosa revisão do material.

1.3.7 *Pellis*

A pileipellis e a estipitipellis apresentam hifas de parede fina a levemente engrossada, dispostas paralelamente, entrelaçadas ou em formato tricotermal, fibuladas ou afibuladas, hialinas a alaranjadas, variando de 2,5 a 5 µm de diâmetro. *Gloeocantharellus corneri*, *G. echinosporus*, *G. persicinus* T.H. Li, Chun Y. Deng & L.M. Wu e *G. uitotanus* Vasco-Pal. & Franco-Mol. apresentam pileipellis gelatinizada (ixocutis), provavelmente devido à superfície viscosa do píleo quando fresco. Pileocistídios estão presentes somente em *G. purpurascens*, e caulocistídios em *G. echinosporus*, *G. purpurascens* e *G. uitotanus*. Hifas gloeopleuras podem estar presentes ou ausentes.

1.3.8 Reação macroquímica

Os basidiomas das espécies de *Gloeocantharellus* apresentam reação macroquímica em contato com sais férricos (FeSO₄ e FeCl₃), ficando verde escuros a pretos. Esta reação é característica da ordem Gomphales, porém muitos autores não a relatam na descrição dos táxons.

1.4 DISTRIBUIÇÃO NO MUNDO E NO BRASIL

Gloeocantharellus apresenta uma distribuição conhecida anfipacífica e predominantemente tropical, tendo registros de espécies para as Américas (Bolívia, Brasil, Colômbia, Estados Unidos e México) e para Ásia e Oceania (Bornéu, China, Ilhas Salomão, Índia, Japão, Malásia, Nova Zelândia, Papua Nova Guiné, Rússia e Sri Lanka) (Tabela 1). No Brasil, há dois registros de ocorrência do gênero, ambos de *G. corneri* (Singer) Corner. Singer (1961) apresentou um registro da espécie para a cidade do Rio de Janeiro, e Watling & De Meijer (1997) registraram a espécie para o estado do Paraná, ambos em áreas de Mata Atlântica. *Gloeocantharellus corneri* possui distribuição conhecida somente para o Brasil.

Tabela 1: Espécies de *Gloeocantharellus* registradas para o mundo

TÁXON	PAÍS	REFERÊNCIAS
<i>Gloeocantharellus corneri</i> (Singer) Corner	Brasil (RJ e PR)	Singer (1961); Watling & De Meijer (1997)
<i>Gloeocantharellus dingleyae</i> (Segedin) Giachini	Nova Zelândia	Segedin (1984)
<i>Gloeocantharellus echinosporus</i> Corner	Malásia Bornéu Ilhas Salomão	Corner (1969)
<i>Gloeocantharellus lateritius</i> (Petch) Corner	Ceilão Índia	Petch (1917); Joseph & Manimohan (1998)
<i>Gloeocantharellus mamorensis</i> (Singer) Giachini	Bolívia	Singer, Araujo & Ivory (1983)
<i>Gloeocantharellus novae-zelandiae</i> (Segedin) Giachini	Nova Zelândia	Segedin (1984)
<i>Gloeocantharellus okapaensis</i> (Corner) Corner	Papua Nova Guiné Ilhas Salomão	Corner (1966); Corner (1969)
<i>Gloeocantharellus pallidus</i> (Yasuda) Giachini	Japão Rússia México	Lloyd (1917); Bulakh & Govorova (2000); Villegas et al. (2010)
<i>Gloeocantharellus persicinus</i> T.H. Li, Chun Y. Deng & L.M. Wu	China	Deng & Li (2008)
<i>Gloeocantharellus purpurascens</i> (Hesler) Singer	EUA México	Smith & Hesler (1943); Villegas et al. (2013)
<i>Gloeocantharellus uitotanus</i> Vasco-Pal. & Franco-Mol.	Colômbia	Vasco-Palacios & Franco-Molano (2005)

1.5 ESTUDOS FILOGENÉTICOS MOLECULARES

Os principais trabalhos envolvendo filogenia molecular que incluem materiais de *Gloeocantharellus* tiveram como finalidade compreender as relações filogenéticas a níveis taxonômicos de ordem e gênero, utilizando os marcadores moleculares nucLSU, mitSSU, nucSSU, *atp6*, RPB2 e EF-1 α (Pine et al. 1999; Hosaka et al. 2006; Giachini et al. 2010).

Pine et al. (1999) estimaram relações filogenéticas de fungos cantarelóides e clavarióides baseadas em sequências de DNA ribossomal mitocondrial e nuclear (nucSSU e mitSSU). *Gloeocantharellus purpurascens*, a espécie-tipo do gênero, foi o único táxon não cantarelóide ou clavarióide de Gomphaceae (já que possui lamelas verdadeiras) incluído no estudo, e agrupou-se no clado “gomphoid-phalloid” com *Gomphus* e *Ramaria*. Segundo os autores este resultado indica que *Gloeocantharellus* representa uma derivação independente de lamelas dentro da linhagem “gomphoid-phalloid”. Todavia, o clado foi representado por uma aparente baixa amostragem de táxons e somente materiais da América do Norte, o que pode resultar em conclusões equivocadas, especialmente relacionado a este grupo, que engloba táxons com ampla diversidade morfológica.

A partir do estudo realizado por Giachini (2004), no qual o autor faz uma revisão do gênero e propõe novas combinações de espécies, Giachini & Castellano (2011) propuseram uma nova classificação taxonômica de *Gomphus* s.l. e a redefinição de *Gloeocantharellus* incluindo 11 espécies no total. Ainda, Giachini et al. (2010) verificaram as relações filogenéticas entre Gomphales, Geastrales, Hysterangiales e Phallales (subclasse Phallomycetidae), e entre táxons dentro de Gomphales, utilizando marcadores nucleares (nuc-LSU rDNA) e mitocondriais (mit-SSU rDNA e mit-*atp6* DNA). O estudo apresenta uma discussão sobre as relações evolutivas dos diferentes clados formados na filogenia, baseada em algumas características morfológicas e os dados moleculares obtidos. A análise filogenética combinada dos três marcadores indicou a monofilia de *Gloeocantharellus*, e elucidou a interrelação dentro de *Gomphus* s.l., o qual formou uma linhagem parafilética dentro de Gomphaceae.

Apesar de todos os estudos com Gomphales até o momento estarem de acordo com a monofilia da ordem, essa conclusão não pode ser considerada definitiva, principalmente porque nenhum destes estudos incluiu todos os gêneros da ordem (González-Ávila et al. 2013).

Com o avanço das técnicas moleculares nas últimas décadas e o seu uso como uma ferramenta para esclarecer as relações entre os diversos grupos de fungos, muitas questões relacionadas a Gomphales foram elucidadas e os dados moleculares auxiliaram na compreensão das relações entre os táxons da ordem, incluindo *Gloeocantharellus* e grupos próximos. Contudo, apesar da localização e das relações de *Gloeocantharellus* estarem bem suportadas dentro da ordem, faltam estudos com uma abordagem filogenética mais aprofundados e focados no gênero e suas espécies.

1.6 JUSTIFICATIVA

Devido principalmente ao baixo número de espécies conhecidas de *Gloeocantharellus*, há poucos trabalhos dedicados ao estudo da biologia e sistemática do gênero. O estudo taxonômico de *Gloeocantharellus* utilizando, além da taxonomia clássica, dados filogenéticos moleculares como uma ferramenta adicional para um melhor entendimento das relações interespecíficas e uma delimitação mais acurada das espécies, torna este um trabalho com uma abordagem e foco diferenciados de *Gloeocantharellus*. Além disso, por ser um gênero com distribuição conhecida predominantemente tropical, a Mata Atlântica brasileira torna-se um cenário incentivador para coletas e estudos com *Gloeocantharellus*.

2 OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi contribuir para o conhecimento taxonômico de *Gloeocantharellus* e para a compreensão das relações filogenéticas entre as espécies do gênero a partir de estudos morfológicos e moleculares, com os seguintes objetivos específicos:

- Realização de coletas de espécimes do gênero no bioma Mata Atlântica e identificação de possíveis novidades científicas;
- Análise de coleções de herbários de *Gloeocantharellus*;
- Análise filogenética molecular de espécies do gênero através da obtenção de sequências de DNA das regiões ITS e mit-*atp6*;
- Contribuição para uma melhor delimitação das espécies do gênero;
- Apresentação de uma discussão geral sobre os aspectos morfológicos dos táxons em conjunto com os dados moleculares obtidos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETAS E PROCEDIMENTOS EM LABORATÓRIO

Foram realizadas saídas de campo, entre 2010 e 2014, para coletas de espécimes de *Gloeocantharellus* em áreas de Mata Atlântica das regiões sul e sudeste do Brasil. As coletas tiveram apoio ou foram realizadas por colegas, incluindo Altielys C. Magnago, Paula Santos e Maria A. Neves.

Em campo, os basidiomas encontrados foram fotografados, coletados com auxílio de um canivete e armazenados temporariamente em uma caixa com divisórias. Os espécimes foram levados para o Laboratório de Micologia da UFSC onde foram feitas descrições macroscópicas a partir de características do basidioma fresco utilizando-se métodos tradicionais de descrição de cogumelos (Largent 1986) e o guia de cores *Online Auction Color Chart* (Kramer 2004). As características observadas e descritas foram dimensões, formato, superfície, consistência e coloração do píleo e do estipe; fixação, espaçamento, disposição e coloração das lamelas; espessura, consistência e coloração do contexto; e hábito, habitat e odor do basidioma. Os espécimes foram desidratados em uma desidratadora a 40°C por aproximadamente 24 horas ou até a completa desidratação do material para, então, serem armazenados em sacos plásticos hermeticamente fechados. Foram realizados testes de reatividade macroquímica com FeSO_4 (sulfato ferroso) 10% no basidioma desidratado.

A análise e descrição das estruturas microscópicas dos materiais foi realizada a partir de cortes à mão livre de seções transversais às lamelas para observação das estruturas do himênio (basidiósporos, basídios, cistídios e hifídios) e da trama da lamela, de seções radiais ao píleo para observação da pileipellis e da trama do píleo, e de seções radiais ao estipe para observação da estipitipellis e da trama do estipe. Ainda, com auxílio de uma pinça foi retirada uma porção do micélio basal localizado na base do estipe para observação das hifas e possíveis outras estruturas. Os cortes foram hidratados com solução de KOH 3% e corados com Vermelho Congo para observação e mensuração das estruturas, e foram verificadas possíveis reações de dextrinoidia com o Reagente de Melzer e cianofilia com o Azul de Algodão. Os cortes foram montados entre lâmina e lamínula e observados em microscopia de luz. As descrições seguiram a metodologia e nomenclatura de

Largent et al. (1977). As estruturas microscópicas analisadas e descritas foram: tamanho (comprimento x largura), formato, parede, ornamentação, conteúdo, reação com reagentes e coloração dos basidiósporos; tamanho, formato e número de esterigmas dos basídios; largura, formato e conteúdo das hifas gloeopleuras; tamanho, formato, conteúdo, coloração e tipo de cystídios; tamanho e formato de hifídios; largura, parede, tipo, presença de fíbulas, arranjo e coloração das hifas da trama, pileipellis, estipitipellis e micélio basal. A mensuração das estruturas foi realizada com auxílio de uma régua micrométrica embutida no microscópio, onde foram medidos por espécime 30 basidiósporos e até 20 elementos de cada uma das outras estruturas. A medida dos basidiósporos incluiu a ornamentação da parede e o apículo, e a dos basídios não incluiu os esterigmas.

Com o propósito de caracterizar de maneira exata a ornamentação da parede dos basidiósporos, caracter de grande valor taxonômico para o táxon, foi realizada Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Para as análises dos basidiósporos em MEV foram retirados pequenos fragmentos do himenóforo, colocados sobre uma fita adesiva de carbono em *stubs* de alumínio, onde foram banhados por uma camada de 30 nm de ouro para, então, serem observados no Microscópio a 10Kev. Tais procedimentos foram realizados no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC (LCME-UFSC).

Os desenhos das estruturas morfológicas foram feitos à mão livre a partir de imagens digitais dos materiais em estudo.

A identificação dos espécimes foi feita a partir da análise e estudo das descrições, anotações e registros fotográficos e da consulta à literatura e especialistas no grupo (Petch 1917; Singer 1961; Corner 1969; Watling & De Meijer 1997; Joseph & Manimohan 1998; Giachini 2004). Os materiais coletados foram ou ainda serão depositados no Herbário FLOR da UFSC.

3.2 COLEÇÕES EXAMINADAS

Foram estudados espécimes de *Gloeocantharellus* dos Herbários K e CGE, todos materiais de referência, incluindo holótipos de espécies. Os mesmos foram analisados microscopicamente e ultraestruturalmente (MEV). Os trabalhos que apresentam a descrição macromorfológica original dos táxons estudados foram devidamente referenciados. A análise dos materiais seguiu os métodos descritos na seção anterior. Os acrônimos dos herbários estão de acordo com Thiers (atualizado

continuamente). Outros herbários também foram contactados para empréstimo de outras coleções de *Gloeocantharellus*, porém não foi possível ter acesso às mesmas.

3.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

Para as análises moleculares foram selecionados todos os espécimes coletados bem como as coleções de herbários que se obteve autorização. Destes, foi retirado um pequeno pedaço do himenóforo (aprox. 10 mg), o qual foi acondicionado em um tubo *ependorf* com sílica para que se mantivesse desidratado até os procedimentos de extração de DNA.

Para elucidar as relações filogenéticas entre as espécies de *Gloeocantharellus* e auxiliar na delimitação das espécies incluídas neste trabalho, utilizou-se dados de dois marcadores moleculares: a região ITS (*internal transcribed spacer*) do DNA nuclear ribossômico, e a região *atp6* (*ATPase subunit 6*) do DNA mitocondrial (Giachini et al. 2010).

A extração do DNA total dos materiais coletados seguiu o protocolo de Romano & Brasileiro (1998), adaptado para fungos (anexo A). Já para os espécimes de coleções de herbários o processo de extração do DNA foi realizado com o *Kit Magnex DNA* seguindo o protocolo do fabricante adaptado para extração de DNA de fungos (anexo B).

Para a amplificação das duas regiões do DNA foi utilizado o mix de PCR da marca ABM® e a receita seguiu as recomendações do fabricante. Em cada amostra, foi utilizado 1 µL do DNA total diluído em água ultrapura Milli-Q numa concentração de 1:10. Para a amplificação das regiões ITS e *atp6* foram utilizados os pares de iniciadores ITS8 e ITS6 (Dentinger et al. 2010) e *atp6-3* e *atp6-2* (Kretzer & Bruns 1999). Os programas utilizados no termociclador para as reações de PCR de cada região do DNA estão especificados na Tabela 2. A amplificação foi verificada para todos os produtos de PCR em gel de agarose 0,8% através da técnica de eletroforese, utilizando-se 2 µL de tampão *blue juice* 2x, 1 µL de GelRed 500x e 2 µL do produto de PCR. Em seguida, os produtos de PCR foram purificados com PEG (polietilenoglicol), para eliminação dos reagentes e de possíveis impurezas (Anexo C).

Tabela 2: Protocolos dos termociclos utilizados nas reações de PCR para cada região do DNA

Regiões do DNA	Ciclos	Temperatura	Tempo
ITS	Desnaturação inicial	95°C	2 min
	5x	95°C	30 s
		60°C	30 s
		72°C	1 min
	25x	95°C	30 s
		55°C	30 s
		72°C	1 min
	Extensão final	72°C	10 min
<i>atp6</i>	5x	94°C	35 s
		37°C	55 s
		*slow ramp até 72°C (2°C/s)	
		72°C	1 min
	30x	94°C	35 s
		45°C	55 s
		72°C	1 min
	Extensão final	72°C	10 min

Posteriormente, as amostras amplificadas e purificadas foram encaminhadas para o sequenciamento no Centro de Pesquisas Renné Rachou na Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) de Belo Horizonte/MG, no âmbito do Projeto Identificação Molecular de Fungos do Brasil. Os pares de *primers* utilizados no sequenciamento da região ITS e *atp6* foram os mesmos utilizados na amplificação.

As sequências geradas foram analisadas e editadas manualmente através do *software* Geneious v6.8 (<http://www.geneious.com>, Kearse et al. 2012). Foram montadas duas matrizes, uma para cada marcador, contendo sequências geradas por este trabalho e algumas disponíveis no banco de dados online Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). Todas as sequências geradas no presente trabalho serão depositadas no mesmo banco de dados. As matrizes finais, contendo todas as sequências, foram alinhadas utilizando o *software* MAFFT v7 (Katoh & Standley 2013) com as estratégias G-INS-i para a matriz de *atp6* e Q-INS-i para a matriz de ITS, e corrigidas manualmente no *software* MEGA 6.06 (Tamura et al. 2013). O modelo de substituição de nucleotídeos mais adequado para cada matriz foi estimado pelo critério AIC (*Akaike Information Criterion*) no *software* jModelTest v2.1.6 (Darriba et al. 2012; Guindon & Gascuel 2003).

Foram utilizados dois métodos de análises filogenéticas para cada marcador molecular. As análises de Máxima Verossimilhança foram realizadas no programa RAxML v. 8.0 (Stamatakis 2014), disponível na plataforma CIPRES Science Gateway (phylo.org), utilizando o modelo GTRGAMMAI, com todos os parâmetros estimados pelo programa, e os valores de suporte sendo acessados através de 500 pseudoreplicações - *bootstrap* (BS). As análises de Inferência Bayesiana foram realizadas no programa Mr. Bayes v. 3.2.3 da plataforma CIPRES Science gateway, usando os modelos de substituição estimados. Cada análise foi feita com 5 milhões de gerações, começando a partir de árvores aleatórias, com duas corridas independentes, cada uma com quatro cadeias correndo paralelamente, amostrando as árvores geradas a cada 500 gerações. O valor da fase inicial de *burn-in* foi 25%, sendo que todas as árvores com o melhor valor de verossimilhança e retidas durante a análise foram usadas para calcular a árvore consenso a partir da regra de maioria de 50%, assim como a probabilidade posterior dos ramos (PP).

Nos cladogramas gerados, um ramo foi considerado bem posicionado se o seu valor de BS foi maior do que 70% e/ou a PP foi maior do que 0,9.

A espécie *Protuberia maracuja* Möller foi utilizada como grupo externo do filograma gerado a partir do marcador *atp6*, e *Gomphus clavatus* (Pers.) Gray para o filograma gerado a partir do marcador ITS. A escolha foi baseada no trabalho de Hosaka et al. (2006), que incluiu estas espécies nas análises filogenéticas moleculares do clado “gomphoid-phalloid”.

Todos os procedimentos moleculares citados, exceto o sequenciamento, foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Botânica da UFSC. As amostras resultantes dos procedimentos de extração, amplificação e purificação estão armazenadas em freezer a -20°C no mesmo Laboratório.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletados cinco espécimes de *Gloeocantharellus* em trilhas das localidades especificadas na Tabela 3. Além destes, foram estudados sete coleções de herbários referentes a três espécies (Tabela 4). Foram identificadas quatro diferentes espécies a partir dos espécimes coletados.

Foi realizada a extração de DNA de 14 materiais. Destes, foram amplificadas as regiões *atp6* e ITS de 13 espécimes cada uma, sendo obtidas sequências da região *atp6* de oito espécimes e sequências da região ITS de dez espécimes.

Todas as espécies analisadas serão discutidas a seguir, primeiramente a partir de uma abordagem morfológica e, após, unindo os dados morfológicos aos dados moleculares.

Tabela 3: Localidades das coletas realizadas durante o trabalho

Estado	Município	Localidade	Coordenadas
Espírito Santo	Santa Teresa	Rebio Augusto Ruschi	19°54'19.60"S 40°34'8.20"O
Paraná	Piraquara	Morro do Canal	25°30'55"S 48°58'53"O
Santa Catarina	Florianópolis	Trilha da Lagoinha do Leste	27°46'43"S 48°29'51"O

Tabela 4: Espécimes estudados durante o período do trabalho

Espécimes	Nº coletor	Local da coleta	Voucher
<i>Gloeocantharellus</i> sp.1	ACM 507	Espírito Santo, BR	FLOR 49692
<i>Gloeocantharellus</i> sp. 1	ACM 524	Espírito Santo, BR	-
<i>Gloeocantharellus</i> sp. 2	ACM 508	Espírito Santo, BR	-
<i>Gloeocantharellus</i> cf. <i>corneri</i>	MAN 750	Paraná, BR	FLOR 47978
<i>Gloeocantharellus</i> aff. <i>echinosporus</i>	FTF 18	Santa Catarina, BR	FLOR 47977
<i>G. echinosporus</i>	Corner s.n.	Singapura, Malásia	CGE 16048
<i>G. echinosporus</i>	RSS 1028A	Ilhas Salomão	CGE 16041
<i>G. echinosporus</i>	RSNB 8275	Bornéu	CGE 16040
<i>G. lateritius</i>	T. Petch 4230	Sri Lanka	K 63156
<i>G. okapaensis</i>	Corner s.n.	Papua Nova Guiné	CGE 16045
<i>G. okapaensis</i>	RSS 731	Ilhas Salomão	CGE 16044
<i>G. okapaensis</i>	RSS 1028A	Ilhas Salomão	CGE 16046

4.1 ANÁLISES FILOGENÉTICAS MOLECULARES

Os alinhamentos finais das matrizes de ITS e *atp6* resultaram em 586 e 663 pares de bases, respectivamente. Os melhores modelos de substituição estimados para cada matriz, assim como as frequências de bases e parâmetros foram: TIM1ef+I+G para a matriz de ITS, com frequência igual para todos nucleotídeos (0,25), com proporção de invariáveis de 0,38 e proporção de variação gamma estimado em 2,42; e HKY+I+G para a matriz de *atp6*, com razão de transições\transversões de 1,02, frequências de A=0,31, C=0,11, G=0,12 e T=0,46), com proporção de invariáveis de 0,31 e proporção de variação gamma estimado em 0,65.

A árvore filogenética gerada a partir do marcador *atp6* incluiu, além de espécies de *Gloeocantharellus*, espécies de gêneros próximos (*Ramaria*, *Turbinellus*, *Gomphus* e *Gautieria* Vittad.) para verificar a monofilia do gênero e confirmar a localização dos espécimes coletados dentro de *Gloeocantharellus*. Porém, neste trabalho serão analisados somente os clados relacionados a *Gloeocantharellus*. As espécies de *Gloeocantharellus* formaram um grupo monofilético, com alto valor de suporte (Fig. 1). Já a árvore filogenética gerada a partir de ITS incluiu

apenas espécies de *Gloeocantharellus*, dando um foco maior nas relações filogenéticas interespecíficas (Fig. 2). A região ITS é um marcador pouco utilizado nos estudos moleculares do grupo, de modo que havia somente duas sequências de espécies de *Gloeocantharellus* disponíveis no Genbank. Deste modo, a árvore ficou limitada a poucas sequências obtidas do banco de dados e pelas sequências geradas no presente trabalho.

O filograma de ITS apresentou dois clados maiores. Um contendo os cinco espécimes coletados durante o trabalho e um espécime de *G. echinosporus*, e o outro com espécimes da Ásia (*Gloeocantharellus* sp.), Oceania (*G. okapaensis*) e EUA (*G. purpurascens*), ambos os clados com alto suporte. Os materiais brasileiros agruparam-se, formando dois clados inclusivos. Os espécimes ACM507 e ACM524, coletados no Espírito Santo, formaram um clado, juntamente com o espécime FTF18, de Santa Catarina, porém este ficou num ramo separado. Os três espécimes apresentaram ramos bem curtos. Um segundo clado foi formado pelos materiais ACM508 e MAN750, coletados no Espírito Santo e Paraná respectivamente. *Gloeocantharellus echinosporus* (CGE16041) formou o grupo-irmão do clado formado pelos espécimes do Brasil. No outro clado maior, *Gloeocantharellus* sp. e *G. okapaensis* (CGE16046) agruparam-se, porém com ramos grandes; e dois espécimes de *G. purpurascens* formaram o outro clado inclusivo.

O filograma de *atp6* apresentou topologia semelhante ao de ITS, porém com a formação de mais clados pelo maior número de sequências deste marcador. As espécies de *Gloeocantharellus* agruparam-se em quatro clados, sendo que os dois mais distantes filogeneticamente são formados apenas por um espécime cada, de *G. pallidus* e *G. novae-zelandiae*. O clado formado pelos espécimes brasileiros apresentou a mesma topologia que na árvore de ITS, porém com um clado inclusivo a mais, contendo dois materiais de *G. echinosporus* (CGE16041 e CGE16040). Outro clado agrupou quatro espécimes de *G. purpurascens* e, como grupo-irmão deste, um clado contendo *Gloeocantharellus* sp. e *G. okapaensis*. *Gloeocantharellus papuanus* apresentou uma divergência da sua localização dentro do clado de *Gloeocantharellus* entre as duas análises realizadas, com um baixo valor de suporte em ambas. No filograma gerado a partir de Máxima Verossimilhança, a espécie formou uma dicotomia com o clado formado pelos espécimes brasileiros e por *G. echinosporus*. Já no filograma de Inferência

Bayesiana, esta ficou mais próxima do clado formado por *G. purpurascens*, *G. okapaensis* e *Gloeocantharellus* sp.

As árvores filogenéticas apresentadas neste trabalho são as geradas por Inferência Bayesiana (Figs. 1 e 2) pois, apesar de ambas as análises apresentarem topologias semelhantes, os ramos referentes a *Gloeocantharellus* tiveram maior suporte nesta. Contudo, os resultados de ambas as análises serão discutidos.

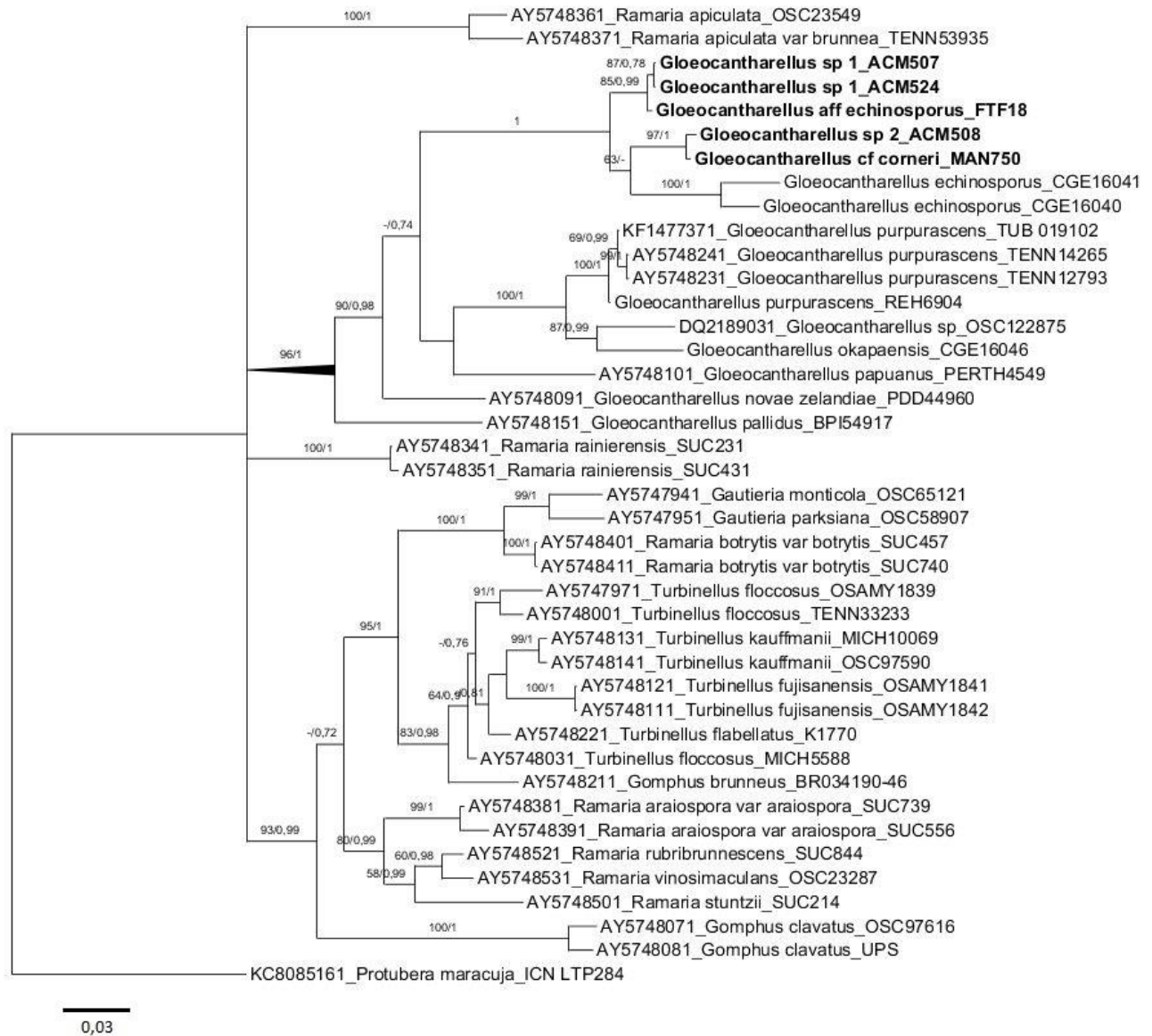


Figura 1. Árvore filogenética representada por *Gloeocantharellus* e outros gêneros de Gomphales, gerada a partir do marcador *atp6*, com a topologia baseada na análise de Inferência Bayesiana. Os números nos ramos representam os valores de BS / valores de PP. O ramo destacado em negrito indica o ramo que origina o clado *Gloeocantharellus*. Os espécimes destacados em negrito representam os materiais coletados durante este trabalho.

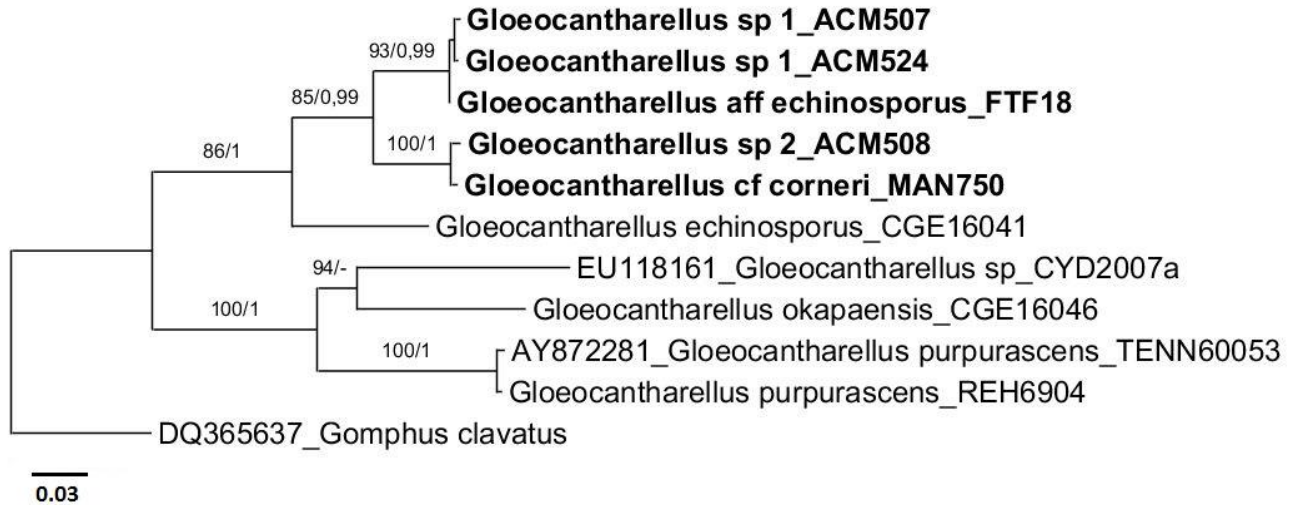


Figura 2. Árvore filogenética representada por espécies de *Gloeocantharellus*, gerada a partir do marcador ITS, com a topologia baseada na análise de Inferência Bayesiana. Os números nos ramos representam os valores de BS / valores de PP. Os espécimes destacados em negrito representam os materiais coletados durante este trabalho.

4.2 TAXONOMIA

Gloeocantharellus cf. corneri

(FIGS. 3A, 4A, 5)

Espécime examinado: BRASIL. Paraná: Piraquara, Morro do Canal, 25°30'55"S, 48°58'53"O, 12/11/2010, P. Santos, MAN 750 (FLOR 47978).

Pileo 29–95 mm, primeiramente convexo com a margem inteira e decurvada, tornando-se plano a levemente depresso com a margem ligeiramente ondulada e reta; superfície glabra e levemente viscosa; laranja avermelhado (OAC 649) no centro, ficando mais claro em direção à margem (OAC 765) quando jovem, tornando-se laranja avermelhado (OAC 649) por toda a superfície. *Lamelas* profundamente decurrentes, próximas entre si, algumas bifurcadas, coloração creme a amarelo claro (OAC 794), lamélulas em 4–5 camadas. *Estipe* 34–75 x 14–19 mm, central, levemente afunilado na base, com a base arredondada, superfície levemente pruinosa quase lisa, laranja claro nos juvenis, tornando-se creme (OAC 795). *Reação macroquímica*: em contato com (ou exposto a) FeSO_4 torna-se rapidamente verde e logo após verde escuro, quase preto.

Basidiósporos (10,5-) 11–14 (-14,5) x (5) 5,5–7 (-7,5) μm , estreitamente elipsoides, amigdaliformes a subfusiformes, hialinos a amarelados individualmente, marrom claro quando em massa, cianofílicos, inamiloides, uni ou multigutulados, parede engrossada ($\pm 1\mu\text{m}$), ornamentação irregularmente verrucosa, com as verrugas de até 1,5 μm comp., obtusas e por vezes fusionadas, apículo de até 2 μm , oblíquo e proeminente, com uma depressão suprahilar em vista lateral. *Basídios* 30–57 x 7–12 μm , subclavados a profundamente clavados, hialinos, com 2–4 esterigmas de 5–7 μm comp. *Gloeocistídios* 35–94 x 4–10 μm , lanceolados a versiformes, afunilando em direção à base longa, ápice obtuso ou quase agudo, afunilado e por vezes protuberante; base inserida no subhimênio ou na trama da lamela, projetando-se no himênio ou raramente além dele; levemente dextrinoides, com a parede fina e um conteúdo densamente alveolado e amarelado; abundantes e presentes por toda a lamela. *Hifídios* 15–35 x 2–4 μm , inconspícuos, filiformes, levemente sinuosos, dispersos no himênio. *Hifas gloeopleuras* de 2–7 μm diam., tortuosas, com conteúdo homogêneo e refringente, ou de 2,5–5 μm diam. e conteúdo densamente alveolado e

amarelado. *Trama da lamela* convergente, frequentemente formando um mediostratum gelatinizado, composta por hifas de 3–12 µm diam., tortuosas e ocasionalmente infladas e por hifas gloeopleuras. *Pileipellis* como cutis formando uma camada conspícua laranja-avermelhada, com hifas de 4–6 µm diam., entrelaçadas, de parede fina a levemente engrossada; superfície como uma camada mais frouxa com hifas de 2–4 µm diam., dispersas, hialinas e com conteúdo condensado e refringente. *Trama do píleo* entrelaçada, tendendo a paralela na margem do píleo e adjacente ao himênio, com hifas de 5–15 µm diam., hialinas, de parede fina, hifas gloeopleuras raramente presentes. *Estipitipellis* triconodermal paliçada de cor marrom-amarelada, com hifas hialinas de 3–8 µm diam., e hifas oleíferas com conteúdo alveolado; caulocistídios abundantes como gloeocistídios; subpellis com hifas entrelaçadas de 3–5 µm diam. *Trama do estipe* com hifas de 3,5–6,5 µm diam., paralelas, hialinas, de parede fina a levemente engrossada; e poucas hifas gloeopleuras com conteúdo refringente; presença de cristais bipiramidais como na trama do píleo. *Micélio basal* com hifas de 2–4,5 µm diam., hialinas, de parede fina a levemente engrossada; hifas gloeopleuras abundantes, frequentemente ramificadas, de parede fina, com conteúdo alveolado; cistos de 10–30 x 8–17 µm, globosos a disformes, com mesmo conteúdo das hifas gloeopleuras. Fíbulas presente nas hifas generativas em todas as partes do basidioma e no micélio basal.

Hábito, habitat e distribuição: Disperso na serrapilheira. Distribuição conhecida para o estado do Paraná, no Parque Estadual do Marumbi, que abrange áreas de Floresta Ombrófila Mista e Densa da Mata Atlântica; e para o litoral da cidade do Rio de Janeiro, no Corcovado, em área de Mata Atlântica s.s.

Comentários: *Gloeocantharellus corneri* é a única espécie do gênero registrada para o Brasil até o momento e com distribuição conhecida restrita ao país. A espécie foi descrita originalmente por Singer (1961) como *Linderomyces corneri* Singer, a partir de um espécime coletado por Corner em 1948 na cidade do Rio de Janeiro. Singer, a partir do material desidratado, descreveu o basidioma como sendo infundibuliforme, o píleo glabro e amarronzado com a margem levemente sulcada, lamelas bifurcadas e moderadamente grossas, e estipe sólido com uma penugem superficial. Microscopicamente, ele descreve os esporos com 11,5–15 x 6,8–8,2 µm, elipsoides a oblongos, com ornamentação irregularmente rugosa e depressão suprahilar,

basídios de 27 a 40 μm , trama da lamela gelatinizada, pileipellis do tipo *cutis* com elementos cuscionoides dispersos e estipitipellis composta por um emaranhado de elementos cuscionoides. Corner (1969) ao revisar o holótipo, apresenta uma descrição do espécime um pouco diferente da de Singer. Ele afirma que o espécime apresenta o píleo viscoso e a margem subvilosa, basídios maiores com 60 a 80 μm de comprimento, pileipellis viscosa com hifas gloeopleuras e estipitipellis formando um himênio estéril. As similaridades entre o espécime examinado e o holótipo de *G. corneri* incluem basidioma robusto com tamanhos similares, píleo viscoso, estipe levemente pruinoso, esporos amigdaliformes com tamanho semelhante, ornamentação irregularmente verrucosa e apículo proeminente, trama da lamela gelatinizada e estipitipellis tricotomal. Porém, apesar destas semelhanças, os dois materiais possuem algumas diferenças morfológicas. Macroscopicamente, *G. corneri* possui o píleo com coloração marrom a amarelada, lamelas amarronzadas e estipe mais delgado. Além disso, Corner (1969) descreve basídios mais compridos e cita a presença de hifas do contexto bastante infladas (16 μm no estipe e 25 μm no píleo), destoando do nosso material, que apresenta apenas a trama do píleo com algumas hifas um pouco infladas (máximo 15 μm de largura).

Watling & De Meijer (1997) relataram o segundo registro da espécie, no estado do Paraná, coletado no Parque Estadual do Marumbi (sem referência exata da localidade), que abrange três municípios, dentre eles Piraquara, cidade onde foi coletado o espécime aqui apresentado. A descrição do espécime apresentado pelos autores adequa-se quase perfeitamente com a do espécime examinado: basidioma alaranjado e levemente úmido, lamelas de cor creme, bifurcadas e não intervenosas, basidiósporos 9–14 x 6–7,5 μm , irregularmente verrucosos e com o apículo grande e proeminente, abundantes pleurocistídios e pileipellis com hifas com conteúdo granular. Os autores, porém, caracterizam a pileipellis como ixocutis e não citam a presença de caulocistídios, os quais são extremamente conspicuos e abundantes neste material. Contudo, apesar dessas discrepâncias, acredita-se que o espécime aqui apresentado trata-se do mesmo táxon que o espécime analisado por Watling & De Meijer (1997), visto que são materiais muito semelhantes morfológicamente e ambos foram coletados na mesma região, de modo que a identificação de *Gloeocantharellus* cf. *corneri* foi baseada neste registro do Paraná.

Tanto o espécime registrado para o Paraná, depositado no herbário pessoal de Andre de Meijer, quanto o coletado por Corner,

depositado no herbário R do Museu Nacional do Rio de Janeiro, não foram revisados pois não foi possível o acesso a ambos os herbários. Além disso, não há sequências de DNA da espécie disponíveis no Genbank, impossibilitando a inclusão da espécie no estudo filogenético molecular deste trabalho e, conseqüentemente, uma identificação mais acurada do material coletado. Sendo assim, é necessário revisar o espécime-tipo de *G. corneri*, bem como incluí-lo nas análises filogenéticas moleculares para confirmar se este material realmente representa o terceiro registro da espécie.

Há duas outras espécies de *Gloeocantharellus* com a superfície do píleo viscosa, *G. echinosporus* e *G. persicinus*. A primeira também possui pileipellis gelatinizada e estipitipellis tricotomal, porém difere de *G. cf. corneri* principalmente pela coloração rosada do basidioma e pelos esporos com ornamentação equinulada (Corner 1969). *Gloeocantharellus persicinus*, apesar de também possuir o basidioma com coloração laranja avermelhada e esporos, elipsoides alongados e verrucosos e pileipellis gelatinizada, tanto o basidioma quanto os esporos são menores que em *G. cf. corneri*, além de apresentar uma estipitipellis composta por hifas paralelas (Deng & Li 2008).

Gloeocantharellus aff. *echinosporus*

(FIGS. 3B, 4B, 6)

Espécime examinado: BRASIL. Santa Catarina: Florianópolis, Pântano do Sul, trilha da Lagoinha do Leste, 27°46'43"S, 48°29'51"O, 04/01/2012, F.T.F. Linhares 18 (FLOR 47977).

Píleo 75 mm de diâmetro, plano tendendo a depresso no centro; margem inteira, reta a levemente arqueada e levemente crenada em algumas partes; superfície seca, lisa e velutínea, levemente fibrilosa em direção à margem; laranja escuro (OAC 756) no centro, passando por salmão claro a amarelo claro (OAC 793) em direção à margem salmão (OAC 632). *Lamelas* profundamente decurrentes, com 4mm de profundidade e 2mm de distância umas das outras, finas, com lamélulas, levemente intervenosas, por vezes bifurcadas mas não anastomosadas, borda ligeiramente fimbriada, coloração creme pálido (OAC 815). *Estipe* 80 x 10–14 mm, central, sólido, cilíndrico, pouco flexível, com a base afunilada e curvada; superfície opaca, glabra a levemente esquamulosa, estriado no ápice em continuação às lamelas formando

estrias rosadas de 12 mm comp.; coloração salmão (OAC 619), clareando em direção à base, tendendo a escurecer com o tempo. *Contexto* 1–2 mm de espessura, branco, macio, esponjoso, torna-se úmido com uma fina camada frágil entre o contexto e a lamela imediatamente após o corte. Odor quase imperceptível. *Reação macroquímica*: FeSO_4 tornando-se rapidamente verde e logo após preto.

Basidiósporos (9-) 9,5–13 (-13,5) x 6–8 (-9) μm , elipsoides a amplamente elipsoides, com a parede grossa (1–2 μm), marrom amarelados quando em massa, levemente dextrinoides, cianofílicos, uni ou multigutulados, ornamentação tuberculada com projeções de até 2 μm e com ápice obtuso; apículo hialino e inconspícuo. *Basídios* 45–73 x 12–16 μm , clavados, afunilando profundamente em direção à base, hialinos; 2–4 esterigmas retos de 5–8 μm comp. *Pleurocistídios* e *queilocistídios* presentes similares em forma e tamanho, de dois tipos: *gloeocistídios* 43–142 x 4–12 μm , de parede fina, cilíndrico-sinuosos a versiformes, afunilando profundamente em direção à base, ápice obtuso a agudo, com conteúdo amarelo amarronzado densamente alveolado, com a base inserida na trama da lamela; *cistídios* 50–120 x 5–11 μm , hialinos, de parede fina, cilindro-ventricosos, com o ápice obtuso, inseridos no himênio ou na trama da lamela. *Hifídios* 17–35 x 2–5 μm , dispersos no himênio, inconspícuos, filiformes, frequentemente tortuosos. *Hifas gloeopleuras* de dois tipos: tortuosas, com 2–5 μm diam. e conteúdo homogêneo e refringente, às vezes ramificadas; e cilíndricas, com 2–10 μm diam. e conteúdo amarelo e alveolado como dos *gloeocistídios*. *Trama da lamela* composta por hifas de 3–9 μm diam., entrelaçadas e por vezes levemente infladas, mediostratum gelatinizado com hifas frouxas e subparalelas e algumas hifas *gloeopleuras* refringentes espalhadas. *Pileipellis* como *ixocutis* composta por hifas de 2–3 μm diam., de parede fina, sinuosas e frouxas, com conteúdo amarelado e gutulado, refringente em KOH; *subpellis* com hifas mais agrupadas e hialinas e raras hifas *gloeopleuras* com conteúdo alveolado. *Trama do píleo* entrelaçada com hifas de 4–36 μm diam., hialinas, de parede fina, frequentemente infladas, e poucas hifas *gloeopleuras* hialinas. *Estipitipellis* do tipo *cutis* com hifas de 4–6,5 μm diam., entrelaçadas, hialinas, de parede fina, com alguns *caulocistídios* como *gloeocistídios*; elementos terminais com parede levemente grossa; raras hifas *gloeopleuras* com conteúdo alveolado. *Trama do estipe* com hifas de 4–7,5 μm diam., regulares e paralelas, e poucas hifas *gloeopleuras* dos dois tipos. *Micélio basal* composto por hifas de 2–5 μm , entrelaçadas, hialinas, de parede fina ficando levemente engrossada

em algumas partes, e hifas gloeopleuras, por vezes ramificadas, com conteúdo alveolado; cistos de 12–20 x 8–16 μm , globosos a disformes, com o mesmo conteúdo das hifas gloeopleuras, presença de ocasionais cristais de até 1 μm . Fíbulas presente nas hifas generativas de todas as partes do basidioma e no micélio basal.

Hábito, habitat e distribuição: Solitário na serrapilheira, na borda da trilha. Mata Atlântica da Ilha de Santa Catarina.

Espécimes adicionais examinados: *Gloeocantharellus echinosporus*. MALÁSIA. Singapura: Bukit Timah, 19/08/1939, *Corner s.n.* (CGE 16048 – holótipo); ILHAS SALOMÃO: Kolombangara, 23/08/1965, RSS 1028A (CGE 16041); BORNÉU: Kinabalu, 14/04/1964, RSNB 8275 (CGE 16040).

Comentários: Este espécime é morfologicamente muito semelhante a *G. echinosporus*, descrito por Corner (1969) para a Malásia, Bornéu e Ilhas Salomão (Ásia e Oceania). Ambos possuem o basidioma robusto; píleo aplanado com coloração rosa alaranjada; lamelas bifurcadas, levemente intervenosas, de cor creme, e atenuadas junto ao ápice do estipe formando estrias; estipe rosa pálido e com a superfície casposa a esquamulosa; esporos elipsoides com tamanhos similares; basídios com 2 a 4 esterigmas; e pileipellis como ixocutis. Porém, *G. echinosporus* possui como característica diagnóstica a presença de esporos com ornamentação equinulada (Fig. 3E), que é caracterizada por ser pontiaguda com “espinhos” de tamanho moderado (Largent et al. 1977). A partir da imagem ultraestrutural (Fig. 3B) observa-se com detalhe a ornamentação dos esporos deste espécime com o ápice obtuso, o que descaracterizaria a ornamentação como equinulada. Nenhuma outra espécie de *Gloeocantharellus* possui esporos com ornamentação intermediária entre o verrucoso e o equinulado, tuberculada neste caso.

Este espécime, além de esporos tuberculados, apresenta basídios clavados profundamente afunilados na base e cistídios hialinos cilindro-ventricosos presentes por todo o himênio. A presença de outros tipos de cistídios, além dos gloecistídios, também foi relatada em outros materiais coletados durante este trabalho, e já foi registrada somente para *G. purpurascens*, presentes porém na pileipellis e não no himênio. Eles não são sinuosos e irregulares como os gloecistídios, apresentando um formato mais cilindro-ventricoso afunilando nas extremidades, porém também tem a base inserida no subhimênio ou no estrato lateral. A pileipellis deste espécime é conspícua e bastante diferenciada,

apresentando hifas com conteúdo gutulado e coloração forte amarelada, não observadas em *G. echinosporus* e nas outras espécies analisadas neste trabalho. Além disso, apesar de não possuir o píleo viscoso, apresenta a pileipellis gelatinizada, característica presente somente nas espécies do gênero com píleo viscoso.

Outras espécies de *Gloeocantharellus* também possuem o basidioma com coloração laranja rosada ou salmão com o píleo seco, como *G. dingleyae*, *G. novae-zelandiae*, *G. okapaensis* e *G. purpurascens*. Porém nenhuma destas possui esporos tuberculados e pileipellis gelatinizada.

Os espécimes de *G. echinosporus* analisados, incluindo o holótipo, apresentam estipitipellis entreteçada tendendo a triconodermis composta por muitos gloecistídios, os quais também estão presentes na *G. aff. echinosporus*, porém em menor quantidade e numa estipitipellis não triconodermis. A mudança de coloração do basidioma ao manuseio também aparece em *G. echinosporus*, porém é um caracter presente em várias espécies de *Gloeocantharellus*. Além disso, *G. echinosporus* possui distribuição conhecida para o sudeste da Ásia e para a Oceania, sendo pouco provável que a espécie também ocorra na América do Sul e tenha uma distribuição disjunta, levando em consideração principalmente a distância oceânica que a separaria. Assim, com base no exposto acima, acreditamos que este material representa uma espécie ainda não descrita para a ciência.

Gloeocantharellus sp. 1

(FIGS. 3C, 4C, 7)

Espécimes examinados: BRASIL. Espírito Santo: Santa Teresa, Reserva Biológica Augusto Ruschi, trilha da Cachoeira, 19°54'19.6"S, 40°34'8.2"O, 04/12/2012, A.C. Magnago 507 (FLOR 49692); estrada entre a sede administrativa e o alojamento Casa da Pedra, 05/12/2012, A.C. Magnago 524.

Píleo 35–50 mm diam., plano-convexo, com a margem decurvada, superfície lisa no centro e com coloração laranja escuro (OAC 631), clareando (OAC 697) e ficando levemente fibrilosa em direção à margem. *Lamelas* fortemente decurrentes, subdistantes a próximas, borda inteira, com lamélulas, às vezes bifurcadas, não intervenosa, com leves ondulações em algumas partes próximas à

margem, coloração branca a creme claro (OAC 909 a 816). *Estipe* 50–80 x 8–17 mm, central, cilíndrico a subclavado, com a base bulbosa em um dos basidiomas, superfície pulverulenta de cor laranja (OAC 631 a 632) no ápice, descamando num fundo creme alaranjado em direção à base, ou laranja claro (OAC 682) por toda a superfície, base branca. Torna-se amarronzado ao ser manuseado.

Basidiósporos (10-) 11–13 (-14) x (6,5-) 7–9 µm, elipsoides a estreitamente elipsoides, alguns amigdaliformes, inamiloides, cianofílicos, muitos unigutulados, ornamentação tuberculada com projeções de ápice obtuso a quase agudo, parede engrossada (até 1 µm), apículo hialino. *Basídios* 51–75 x 10–14 µm, clavados, hialinos, esterigmas de até 8 µm comp. Pleurocistídios e queilocistídios presentes similares em forma e tamanho, de dois tipo: *gloeocistídios* 63–129 x 7–11 µm, versiformes a fusiformes, afunilando profundamente e ficando bem sinuoso em direção à base, com conteúdo densamente alveolado e amarelo amarronzado, base inserida no subhimênio ou na trama da lamela, raramente sobressaem o himênio; *cistídios* 83–125 x 9–12 µm, hialinos, cilindro-ventricosos, dilatando em direção à parte mediana, com o ápice obtuso. *Hifídios* 27–40 x 3–4 µm, filiformes e sinuosos, dispersos no himênio. *Hifas gloeopleuras* de dois tipos: com conteúdo refringente, sinuosas, às vezes ramificadas, de 2–7 µm diam.; e com conteúdo alveolado como dos *gloeocistídios*, às vezes ramificadas, de 2–4 µm diam., presentes no micélio basal. *Trama da lamela* gelatinizada, com hifas de 2–10 (-16) µm diam., hialinas, mediostratum com hifas subparalelas e algumas hifas *gloeopleuras* tortuosas com conteúdo refringente. *Pileipellis* como ixocutis, com hifas de 3–5 µm diam., frouxas, entrelaçadas, sinuosas, de parede fina; superfície com hifas mais estreitas de 1,5–3 µm diam. com conteúdo granular e refringente. *Trama do píleo* com hifas de 5–17 µm diam., entrelaçadas, de parede fina a levemente grossa em algumas partes, infladas e hialinas; algumas hifas *gloeopleuras* refringentes. *Estipitipellis* tricotermal paliçada tornando-se mais paralela em alguns locais, com hifas de 3–8 µm diam., cilíndricas a cilindro-clavadas ou quase lanceoladas, parede fina e levemente engrossada na superfície; caulocistídios como *gloeocistídios*. *Trama do estipe* com hifas de 2,5–9 µm diam., com a parede fina a levemente grossa, paralelas, hialinas; algumas hifas *gloeopleuras*, tortuosas e refringentes. *Micélio basal* com hifas de 2–3 µm diam., hialinas, com a parede levemente grossa, *gloeocistídios* e hifas *gloeopleuras* com conteúdo alveolado, espalhadas entre as outras hifas; cistos de 11–20 x 8–18 µm, globosos a disformes, com conteúdo

alveolado como dos gloeocistídios. Fíbulas presentes nas hifas generativas em todas as partes do basidioma e no micélio basal.

Hábito, habitat e distribuição: Terrestre, muitos basidiomas, formando anel de fadas. Distribuição conhecida somente para a Mata Atlântica do estado do Espírito Santo.

Comentários: O espécime ACM 507 foi coletado juntamente com *Gloeocantharellus* sp. 2 (ACM508) como sendo o mesmo espécime, pois estavam misturados na mesma área de coleta, em uma grande quantidade de basidiomas e eram morfológicamente muito similares. Em laboratório, com a análise microscópica e uma análise macroscópica mais detalhada, percebeu-se uma diferenciação entre os espécimes na coloração dos basidiomas e na ornamentação dos esporos e, assim, concluiu-se que de fato tratavam-se de espécies diferentes. Porém, ainda assim, a diferença macromorfológica entre as espécies é muito sutil e o único caracter micromorfológico capaz de separá-las é a ornamentação dos esporos.

Esta espécie é caracterizada por ter um basidioma de porte pequeno, se comparada com as outras espécies do gênero, apresenta uma coloração alaranjada, a margem do píleo fibrilosa, as lamelas de cor creme e o estipe com a superfície pulverulenta. Possui esporos elipsoides com ornamentação tuberculada, cistídios hialinos no himênio além dos gloeocistídios, dois tipos de hifas gloeopleuras, trama da lamela e pileipellis gelatinizada e estipitipellis triconodermis paliçada com alguns caulocistídios. Além disso, os basidiomas tornam-se amarronzados quando manuseados.

A coloração alaranjada do basidioma é bem frequente nas espécies do gênero. *Gloeocantharellus echinosporus*, *G. okapaensis*, *G. novae-zelandiae* e *G. persicinus* possuem essa coloração, variando de laranja mais forte para mais rosado. As duas últimas possuem esporos com ornamentação verrucosa e *G. okapaensis* ornamentação rugosa. *Gloeocantharellus echinosporus* é a espécie mais similar a *Gloeocantharellus* sp. 1 com relação aos esporos. Porém, esta espécie apresenta esporos semelhantes aos de *G. aff. echinosporus*, não chegando a ser echinulados (Fig. 3C). Além disso, *G. echinosporus* possui um basidioma maior e mais robusto, a trama da lamela não é gelatinizada e a estipitipellis é composta quase inteiramente por gloeocistídios. A presença de outros tipos de cistídios além dos gloeocistídios foi relatada somente para *G. purpurascens*, e foi observada também em outros espécimes coletados neste trabalho, como

já comentado anteriormente. A trama da lamela gelatinizada também é bastante presente nas espécies de *Gloeocantharellus*. Todos os materiais coletados neste trabalho possuem ou toda a trama gelatinizada, ou somente o mediostratum. *Gloeocantharellus corneri*, *G. echinosporus* e *G. okapaensis* também apresentam esta característica.

Este táxon é morfologicamente semelhante a *G. aff. echinosporus*, porém tratam-se de espécies diferentes principalmente por *G. aff. echinosporus* apresentar o basidioma mais robusto e rosado, o píleo maior (75 mm) e a estípite como *cutis*. Além disso, apesar dos esporos de ambas possuírem ornamentação muito similar, em *Gloeocantharellus* sp. 1 esta é quase equinulada, não chegando porém a ser como em *G. echinosporus*.

Como discutido, *Gloeocantharellus* sp. 1 possui características morfológicas que também estão presentes em outras espécies do gênero, contudo o conjunto destas características que delimitam este táxon nos permite concluir que esta representa uma espécie de *Gloeocantharellus* ainda não descrita para a ciência.

Gloeocantharellus sp. 2

(FIGS. 3D, 4D, 8)

Espécime examinado: BRASIL. Espírito Santo: Santa Teresa, Reserva Biológica Augusto Ruschi, trilha da Cachoeira, 19°54'19.6"S, 40°34'8.2"O, 04/12/2012, A.C. Magnago 508.

Píleo depresso no centro, superfície lisa no centro ficando fibrilosa em direção à margem, levemente viscosa, margem incurvada nos imaturos tornando-se decurvada nos maduros, primeiramente laranja claro (OAC 654), ficando vermelho-alaranjada (OAC 615 a 616) no centro e clareando (OAC 618 a 631) em direção à margem nos maduros, ou avermelhada (OAC 616) por toda a superfície. *Lamelas* fortemente decurrentes, profundas, com lamélulas, às vezes bifurcadas, coloração branca nos imaturos tornando-se creme clara (OAC 816) nos maduros. *Estípe* 20–45 x 7–12 mm, cilíndrico, superfície pulverulenta laranja (OAC 631) no ápice, descamando e ficando lisa e creme alaranjando em direção à base, laranja claro (OAC 634) nos imaturos. Torna-se arroxeadado ao ser manuseado.

Basidiósporos (9,5-) 10–12 (-13) x 5–6,5 (-7) µm, estreitamente elipsoides, amigdaliformes a subfusiformes, amarelados em KOH,

inamiloides, cianofílicos, com parede grossa, ornamentação sinuosamente verrucosa-estriada a reticulada, maioria unigutulado, com uma depressão suprahilar em vista lateral. *Basídios* 48–69 x 9–11 µm, clavados a levemente clavados, hialinos, tetraesterigmadó com esterigmas de 5–7 µm comp. *Hifas gloeopleuras* de dois tipos: tortuosas, com 2,5–4,5 µm diam. e conteúdo homogêneo e refringente, às vezes ramificadas; e cilíndricas, com 3–4 µm diam. e conteúdo densamente alveolado como dos gloecistídios. Pleurocistídios e queilocistídios presentes similares em forma e tamanho, de dois tipos: *gloeocistídios* 60–129 x 5–10 µm, escassos, cilíndricos a lanceolados, tortuosos, afunilando em direção à base, base obtusa a inclinada inserida na trama da lamela, raramente sobressaem o himênio, conteúdo densamente alveolado; *cistídios* 76–120 x 6–8 µm, hialinos, cilíndricos afunilando na base, com o ápice mais estreito e obtuso, de parede fina, dispersos no himênio, com a base inserida na trama da lamela, frequentemente sobressaindo o himênio. *Hifídios* 20–35 x 2–4 µm, filiformes, dispersos no himênio. *Trama da lamela* gelatinizada, com hifas de 3–9 (–13) µm diam., hialinas, mediostratum subparalelo, algumas hifas gloeopleuras refringentes. *Pileipellis* como ixocutis de coloração vermelho-alaranjada, ficando amarelada em KOH, hifas de 2,5–5 µm diam., bem sinuosas, entrelaçadas, com conteúdo refringente e parede fina; hifas da superfície diferenciadas, de 1,5–3 µm diam., com conteúdo gutulado/granulado e parede fina; pileocistídios não observados. *Trama do píleo* com hifas de 6,5–15 µm diam., frequentemente infladas, hialinas, entrelaçadas, com parede fina a engrossada em algumas partes. *Estipitipellis* tricotermal paliçada tornando-se mais horizontal como uma cutis em alguns locais, com coloração marrom avermelhada ou amarelada, hifas terminais cilíndricas, cilindro-clavadas ou fusoides, de 3,5–7 µm diam.; hifas gloeopleuras com conteúdo alveolado; caulocistídios abundantes, como gloecistídios. *Trama do estipe* com hifas de 3,5–13 µm, paralelas, hialinas, de parede fina a engrossada em algumas partes (até 2 µm); hifas gloeopleuras raramente presentes. *Micélio basal* composto por hifas de 2–6 µm diam., entrelaçadas, de parede fina a levemente engrossada, hialinas a amareladas; algumas hifas gloeopleuras com conteúdo alveolado; cistos de 9,5–17 x 8,5–16 µm, globosos a amorfos, com conteúdo como dos gloecistídios. Fíbulas presentes nas hifas generativas em todas as partes do basidioma e no micélio basal.

Hábito, habitat e distribuição: Sobre o solo, em serrapilheira de local aberto. Distribuição conhecida somente para a Mata Atlântica do estado do Espírito Santo, Brasil.

Espécimes adicionais examinados: SRI LANKA. Peradeniya, Novembro de 1914, *T. Petch* 4230 (K 63156 – como *Paxillus lateritius* – isotipo).

Comentários: *Gloeocantharellus* sp. 2 foi coletado na mesma área que *Gloeocantharellus* sp.1 (ACM 507), a qual é morfológicamente muito similar, como já comentado. Contudo, este táxon possui algumas diferenças do anterior. Macroscopicamente, ele possui basidiomas de pequeno porte, píleo com o centro depresso e vermelho vivo ficando alaranjado em direção à margem, lamela de cor creme e estipe com a superfície pulverulenta. Ainda, o basidioma torna-se arroxeadado quando manuseado, como em *Gloeocantharellus* sp. 1 e outras espécies do gênero. Microscopicamente, apresenta esporos amigdaliformes a subfusiformes com ornamentação amplamente estriada a reticulada (Fig. 3D), cistídios hialinos no himênio além dos gloecistídios, dois tipos de hifas gloeopleuras, trama da lamela e pileipellis gelatinizada, contexto com hifas infladas e estipitipellis tricolorada paliçada.

A presença de hifas gloeopleuras umas com conteúdo alveolado como dos gloecistídios e outras com conteúdo homogêneo e hialino também foi observada em *Gloeocantharellus* sp. 1 e *G. aff. echinosporus*. Ambas são descritas para as outras espécies do gênero, porém não se sabe se elas estão de alguma forma relacionadas. A hifa com conteúdo alveolado está frequentemente conectada aos gloecistídios, já a outra sempre aparece isolada no meio das hifas comuns, sem conexão com nenhuma outra estrutura.

Esta espécie é morfológicamente similar a *G. lateritius*, espécie registrada para o Sri Lanka e para a Índia (Pegler 1986; Joseph & Manimohan 1998). Ambas possuem basidiomas pequenos e com o mesmo formato, píleo e estipe com coloração avermelhada e lamelas creme e bifurcadas, estipe com sutis esquamas, esporos com tamanhos similares e com uma depressão suprahilar. Porém, *G. lateritius* possui esporos com ornamentação rugosa bem sutil, basídios menores (37–45 x 5–7 µm), hifas gloeopleuras com conteúdo alveolado extremamente abundantes por todo o contexto e trama da lamela, gloecistídios também abundantes no himênio como extensões das hifas gloeopleuras da trama da lamela e pileipellis não gelatinizada.

Gloeocantharellus sp. 2 também pode ser comparada a *G. uitotanus*, espécie registrada para a Amazônia colombiana, com

basidioma pequeno e avermelhado, píleo úmido, estipe tomentoso, pileipellis gelatinizada e estipitipellis tricoloral (Vasco-Palacios & Franco-Molano 2005). Contudo, possui esporos menores (8–12 x 4–6,5 µm) e com ornamentação verrucosa, trama da lamela com hifas gloeopleuras com conteúdo granular e trama do píleo com hifas bem mais delgadas (3–4 µm de diâmetro).

Os esporos desta espécie, assim como os de *G. aff. echinosporus* e *Gloeocantharellus* sp. 1, possuem uma ornamentação diferente das descritas para as espécies do gênero. Esta apresenta estrias largas e sinuosas, chegando a formar reticulações. A maioria dos esporos das espécies de *Gloeocantharellus* possuem ornamentação verrucosa e frequentemente as “verrugas” anastomosam formando algumas estrias, porém nunca tornando-se reticulada como nesta espécie.

Com isso, acreditamos que provavelmente este táxon represente uma nova espécie de *Gloeocantharellus*, sendo a única até então com esporos reticulados.

Gloeocantharellus echinosporus Corner, Nova Hedwigia 18(2-4): 801 (1969).

(FIGS. 4E, 9)

Espécimes examinados: MALÁSIA. Singapura: Bukit Timah, 19/08/1939, *Corner s.n.* (CGE 16048 – holótipo); ILHAS SALOMÃO: Kolombangara, 23/08/1965, RSS 1028A (CGE 16041); BORNÉU: Kinabalu, 14/04/1964, RSNB 8275 (CGE 16040).

Descrição macroscópica em Corner (1969).

Basidiósporos (10,5-) 11–13 (-13,5) x 6,5–8 µm, elipsoides a estreitamente elipsoides, com formato bem variável, de amigdaliformes a subfusiformes, ornamentação equinulada com o ápice agudo e cianofílica; apículo proeminente, muitos com uma depressão suprahilar em vista lateral. *Basídios* 51–70 x 9–11 µm, clavados, hialinos, tetrasterigmado. *Gloeocistídios* 55–122 x 7–15 µm, versiformes a lanceolados, com o ápice e base atenuados, conteúdo densamente alveolado amarelo amarronzado em KOH, porém alguns com menos conteúdo e mais hialinos, parede fina, base inserida no subhímênio ou na trama da lamela, mais abundantes na ponta da lamela, presentes também na estipitipellis e no píleo. *Hifas gloeopleuras* 3–6 µm diam., hialinas e refringentes, presentes na trama da lamela e raramente na

trama do píleo e do estipe. *Trama da lamela* com hifas paralelas tendendo a entrelaçadas, ou entrelaçadas com o mediostratum paralelo. *Pileipellis* como ixocutis, com hifas de 2–4 µm diam., de parede fina, com conteúdo refringente e às vezes granuloso. *Trama do píleo* com hifas entrelaçadas tendendo a paralelas, hialinas a amareladas em KOH. *Estipitipellis* entrelaçada a tricodermal paliçada, amarronzada em KOH, composta por muitos caulocistídios do tipo gloecistídio e hifas de 2–6 µm diam., cilíndricas e de parede fina. *Trama do estipe* com hifas paralelas, raras hifas gloeopleuras. *Micélio basal* composto de hifas de 2–6 µm, entrelaçadas, hialinas, de parede fina, muitos gloecistídios e cistos de 15–22 x 12–19 µm, globosos a amorfos, com conteúdo alveolado como dos gloecistídios. Fíbulas presentes em todas as partes do basidioma e no micélio basal.

Hábito, habitat e distribuição: Solo na floresta, frequentemente enraizado. Distribuição conhecida nos países tropicais Malásia, Bornéu e Ilhas Salomão.

Comentários: *Gloeocantharellus echinosporus* foi descrita por Corner (1969) para a região sudeste da Ásia e nordeste da Oceania, a partir de dez materiais coletados em diferentes épocas, dos quais três foram analisados neste estudo. A principal característica deste táxon é a ornamentação dos esporos equinulada (Fig. 3E), a qual é relatada somente nesta espécie de *Gloeocantharellus*. Esta espécie é caracterizada macromorfológicamente por ter o basidioma robusto, o píleo com até 13,5 cm de diâmetro, aplanado a infundibuliforme, com a margem levemente subvilosa, superfície viscosa, esquamulosa no centro e cor rosa alaranjada; estipe de até 10 cm de comprimento, sólido, com a superfície pruinosa ou vilosa e cor amarela a rosa pálido; e lamelas atenuadas junto ao estipe formando linhas, bifurcadas e amarronzadas. Corner (1969) ainda cita a mudança de coloração para arroxeadado em todas as partes do basidioma quando manuseados.

Corner (1969) relata a presença de um glóbulo apical no ápice dos gloecistídios com o mesmo conteúdo destes. Esta estrutura também foi observada nesta revisão, porém trata-se claramente do conteúdo dos gloecistídios extravasado, visto que não possui uma delimitação marcada e está presente nos gloecistídios que perderam parte do conteúdo. Foi observado muitos gloecistídios mais dilatados no himênio, com até 15 µm, diferentes dos observados nos outros táxons. Esta espécie apresenta uma *estipitipellis* tricodermal quase inteiramente formada por gloecistídios e poucas hifas.

Apesar dos espécimes analisados estarem em bom estado, as hifas do contexto estavam colapsadas e não foi possível medi-las. Porém, segundo Corner (1969), esta espécie apresenta hifas do contexto bastante dilatadas, com até 22 μm de largura. Todas as outras características analisadas nos materiais corroboram com a descrição de Corner (1969), como esporos com tamanho similar e amigdaliformes, pileipellis gelatinizada e estipitipellis tricoloral.

Gloeocantharellus lateritius (Petch) Corner, Nova Hedwigia 18(2-4): 803 (1969).

(FIGS. 4F, 10)

≡ *Paxillus lateritius* Petch 1917

≡ *Phyllobolites lateritius* (Petch) Singer 1942

≡ *Linderomyces lateritius* (Petch) Singer 1947

≡ *Gomphus lateritius* (Petch) R.H. Petersen 1968

Espécime examinado: SRI LANKA. Peradeniya: Kandy Distr., Central Prov., Novembro de 1914, *T. Petch* 4230 (K 63156 – como *Paxillus lateritius* – isotipo).

Descrição macroscópica em Petch (1917) e Giachini (2004).

Basidiósporos 9–12,5 x (5-) 6–7,5 (-8) μm , elipsoides, com o ápice frequentemente mais afilado porém obtuso, parede engrossada, ornamentação delicadamente rugosa, hialinos, às vezes unigutulados. *Hifas gloeopleuras* de 2–7 μm diam., abundantes na trama da lamela, com conteúdo alveolado como dos gloeocistídios, frequentemente sinuosas. *Gloeocistídios* 68–178 x 6–10 μm , versiformes a lanceolados, frequentemente sinuosos, com o ápice atenuado, parede fina, conteúdo densamente alveolado e amarelo-amarronzado, extremamente abundantes no himênio, muitos como uma extensão das hifas gloeopleuras da trama da lamela, às vezes sobressaindo o himênio. *Pileipellis* entrelaçada a tricoloral, com hifas de 3–7 μm diam., de parede fina, refringentes, e hifas gloeopleuras abundantes na subpellis. *Trama do píleo* com hifas entrelaçadas tendendo a paralelas, amareladas e refringentes em KOH, com hifas gloeopleuras abundantes. *Estipitipellis* com hifas de 2,5–6 μm diam., entrelaçadas a paralelas, frouxas entre si, de parede fina a engrossada, hifas gloeopleuras abundantes dispersas entre as outras hifas. *Trama do estipe* com hifas

paralelas de 5–9 μm diam., com parede fina a levemente engrossada, e hifas gloeopleuras. Fíbulas presentes.

Hábito, habitat e distribuição: Terrestre. Sri Lanka e Índia.

Comentários: *Gloeocantharellus lateritius* foi descrita primeiramente por Petch (1917) como um registro para o Sri Lanka como *Paxillus lateritius*. Apesar de se tratar de uma nova espécie, Petch apresentou uma descrição microscópica pouco detalhada, relatando somente as características dos esporos, e tampouco fez qualquer comentário adicional sobre o táxon. Segundo o autor, o espécime possuía um basidioma com coloração avermelhada a ocre, o píleo com até 6 cm de diâmetro, depresso e levemente tomentoso, o estipe com até 5 cm de comprimento por 1 cm de largura, sólido e coberto por minúsculos pontos vermelhos, e lamelas cor creme, além de esporos ovais, levemente verrucosos e com 8–9 x 6–7 μm . Além disso, Petch relata a mudança de coloração do basidioma ao manuseio ou corte, tornando-se arroxeadado, caracter presente em outras espécies de *Gloeocantharellus*. Singer (1947) propõe o gênero *Linderomyces* após revisar este espécime e relatar a presença de hifas e cistídios com aspecto esponjoso, os elementos coscinoides, contestado posteriormente por Petersen (1968) e Corner (1969) ao afirmarem que tais estruturas eram hifas gloeopleuras e gloecistídios como os de *Gloeocantharellus*, propondo assim a sinonimização dos gêneros. Petersen (1971), ao revisar o mesmo material, descreve esporos um pouco maiores do que Petch (1917), com 9–10.5 (–11.5) x 5.5–7 μm .

Uma descrição mais detalhada do tipo é apresentada por Pegler (1986), o qual descreve esporos consideravelmente maiores do que a descrição original da espécie, com 10–13.5 x 6–7 μm . Além disso, ele afirma que os gloecistídios são extremamente abundantes por todo o himênio e chegam a até 150 μm de comprimento, e a pileipellis é composta por hifas compactas e rastejantes.

Joseph & Manimohan (1998) apresentaram o segundo registro da espécie, para a Índia, país próximo ao Sri Lanka. O espécime descrito é macro e micromorfológicamente muito semelhante ao tipo de *G. lateritius*, porém os autores descrevem basídios maiores e mais largos (49–68 x 7–9.5 μm , contra 37–45 x 5–7 μm do tipo) e a pileipellis como sendo tricoloral.

O isótipo analisado não estava em bom estado e apresentava as hifas da trama colapsadas, não sendo possível mensurá-las, como já relatado por Petersen (1971) e Pegler (1986). Segundo Corner (1969), a

espécie necessitaria ser redescoberta pois não é possível obter muitos detalhes microscópicos do tipo.

Esta espécie apresenta gloecistídios e hifas gloeopleuras extremamente abundantes por todo o basidioma, característica relatada também por Pegler (1986), sendo o primeiro presente no himênio e *pellis*, e o segundo por todo o contexto. Grande parte dos gloecistídios observados no himênio eram como extensões das hifas gloeopleuras da trama da lamela, diferente de outros materiais analisados, como *G. echinosporus* e os espécimes brasileiros, nos quais os gloecistídios são estruturas delimitadas separadas das hifas gloeopleuras. A medida dos esporos nesta análise está mais de acordo com a descrição feita por Petersen (1971) e não tanto com a da descrição original da espécie (Petch 1917). Além disso, os esporos possuem o ápice característico, sendo mais afunilado, porém arredondado, relatado também por Pegler (1986), e ornamentação delicadamente rugosa (Fig. 3F). A *pileipellis* é entrelaçada a tricodermal, como descrito para o espécime da Índia (Joseph & Manimohan 1998), porém diferente da *pileipellis* descrita por Pegler (1986), apesar de ser o mesmo material analisado. Os outros caracteres estão de acordo com a descrição de Pegler (1986).

Gloeocantharellus okapaensis (Corner) Corner, Nova Hedwigia 18(2-4): 803 (1969).

(FIGS. 4G, 11)

≡ *Gomphus okapaensis* Corner 1966

Espécimes examinados: PAPUA NOVA GUINÉ. Okapa, 11/10/1960, Corner s.n. (CGE 16045 – as *Gomphus okapaensis* – holótipo); ILHAS SALOMÃO. San Cristobal (atualmente Ilha de Makira), Julho de 1965, RSS 731 (CGE 16044); Kolombangara, 23/08/1965, RSS 1028B (CGE 16046).

Descrição macroscópica em Corner (1966, 1969).

Basidiósporos 10–13 x 6–7,5 (-8) µm, elipsoides, de parede engrossada, com ornamentação delicadamente rugosa e inconspícua. *Hifas gloeopleuras* de 2,5–6 µm diam., sinuosas, com conteúdo alveolado como dos gloecistídios, abundantes na trama. *Gloeocistídios* cilíndricos a versiformes, com o ápice afunilado e obtuso, conteúdo densamente alveolado e amarelado, refringente, como uma extensão no himênio das hifas oleíferas da trama da lamela e com diâmetro igual a

estas, com a base sinuosa no subhimênio, abundantes em todo o himênio. *Trama da lamela* gelatinizada com hifas de 2–6 µm diam., de parede fina, entreteçadas com hifas gloeopleuras extremamente abundantes principalmente no mediostratum. *Pileipellis* tricotermal, com hifas de 4–7 µm diam., cilíndricas a levemente clavadas, refringentes, de parede levemente engrossada; subpellis com hifas entreteçadas, de parede levemente engrossada, com algumas hifas gloeopleuras. *Trama do píleo* com hifas subparalelas e muitas hifas gloeopleuras. *Estipitipellis* entreteçada a tricotermal, frequentemente formando fascículos hifais, com hifas de 3,5–6 µm diam., frouxas a mais condensadas, cilíndricas, refringentes, de parede levemente engrossada; subpellis com hifas entreteçadas. *Trama do estipe* com hifas de 2,5–7,5 µm diam., paralelas, tendendo a ficar mais entreteçadas em alguns locais, amareladas em KOH, de parede fina a engrossada, e hifas gloeopleuras abundantes. Fíbulas presente em todas as partes dos basidiomas.

Hábito, habitat e distribuição: Solo na floresta, solitário ou dois juntos. Conhecido somente para a Oceania, em Papua Nova Guiné e Ilhas Salomão.

Comentários: *Gloeocantharellus okapaensis* foi registrado por Corner (1969) para Papua Nova Guiné e Ilhas Salomão, duas ilhas próximas na Oceania. A principal característica que distingue a espécie é a presença de projeções finas e irregulares nas hifas terminais da superfície do píleo e do estipe, a qual não é relatada para nenhuma outra espécie de *Gloeocantharellus*. Contudo, estas estruturas não foram observadas em nenhum dos espécimes analisados neste trabalho. Corner (1969) descreve macromorfológicamente a espécie com um basidioma robusto; o píleo de até 10 cm de diâmetro, plano-convexo a infundibuliforme, margem incurvada, superfície seca com pequenas esquamulas e cor laranja rosada; o estipe de até 12 cm de comprimento e 1,5 cm de largura, afunilando em direção à base, com a superfície pruínosa e ápice branco ficando amarronzado em direção à base; lamelas subgelatinosas, cor branca a amarronzada; e contexto branco tornando-se arroxeado quando manuseado.

O material tipo não está bem preservado e, segundo Corner (1969), trata-se de um basidioma jovem. Além disso, Corner (1969) também relata que as lamelas dos espécimes desidratados tornam-se escuras, característica também observada na presente análise.

Os esporos de *G. okapaensis* possuem uma ornamentação delicadamente rugosa, porém mais inconspícua ainda que em *G. lateritius* (Fig. 3G). Esta espécie também apresenta gloecistídios mais cilíndricos e delgados do que nos outros táxons observados, além de ser uma extensão das hifas gloeopleuras da trama da lamela, como em *G. lateritius*. As hifas gloeopleuras são extremamente abundantes em todo o contexto e na trama da lamela. Outro caracter frequente nos espécimes analisados é a presença de fascículos na estipitipellis, formado por algumas hifas terminais. Estes são mais frequentes e conspícuos no espécime CGE 16046, provavelmente por ter o estipe visivelmente mais pruinoso que os outros espécimes. Todos os caracteres observados estão de acordo com a descrição de Corner (1969), exceto as projeções das hifas da *pellis*, como já mencionado.

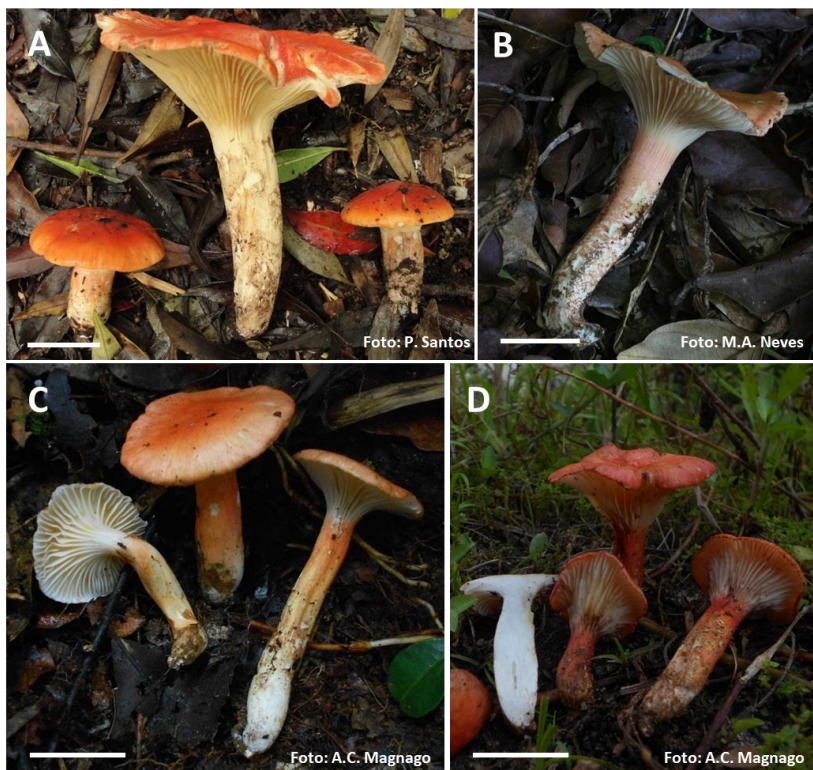


Figura 3. Basidiomas em campo dos espécimes de *Gloeocantharellus* coletados durante o período do trabalho. **A:** *Gloeocantharellus* cf. *corneri*; **B:** *Gloeocantharellus* aff. *echinosporus*; **C:** *Gloeocantharellus* sp. 1; **D:** *Gloeocantharellus* sp. 2. Escala = 2,5 cm.

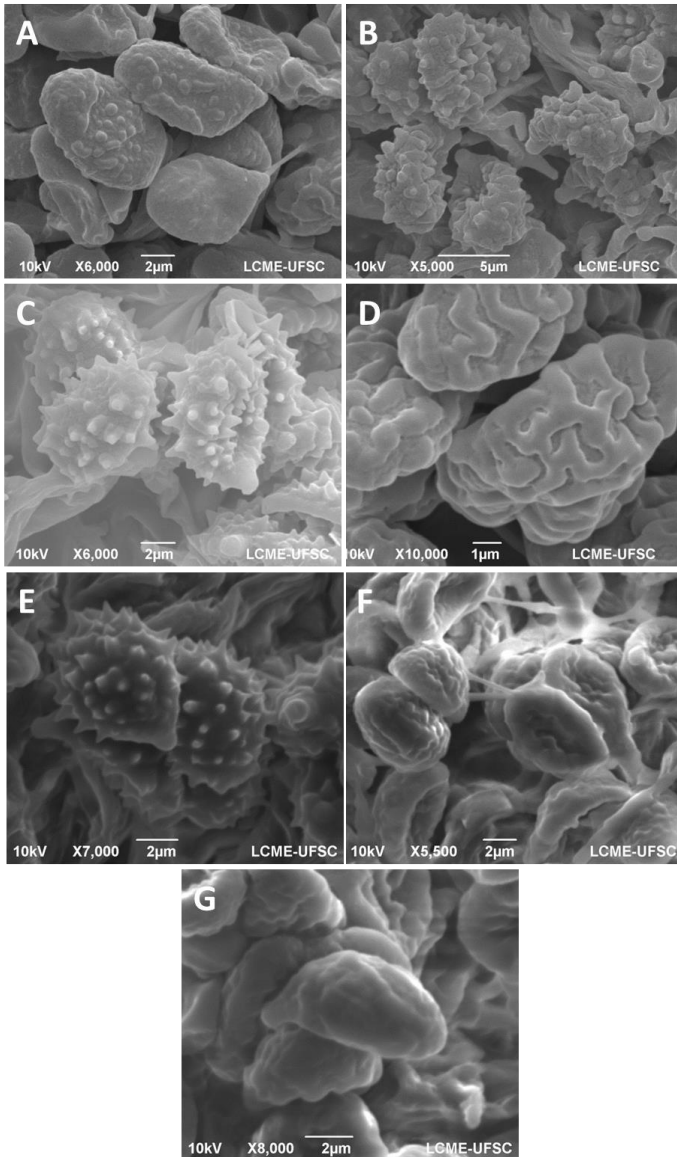


Figura 4. Fotos em MEV dos basidiósporos de *Gloeocantharellus*. **A:** *Gloeocantharellus* cf. *corneri*; **B:** *Gloeocantharellus* aff. *echinosporus*; **C:** *Gloeocantharellus* sp.1; **D:** *Gloeocantharellus* sp.2; **E:** *G. echinosporus*; **F:** *G. lateritius*; **G:** *G. okapaensis*.

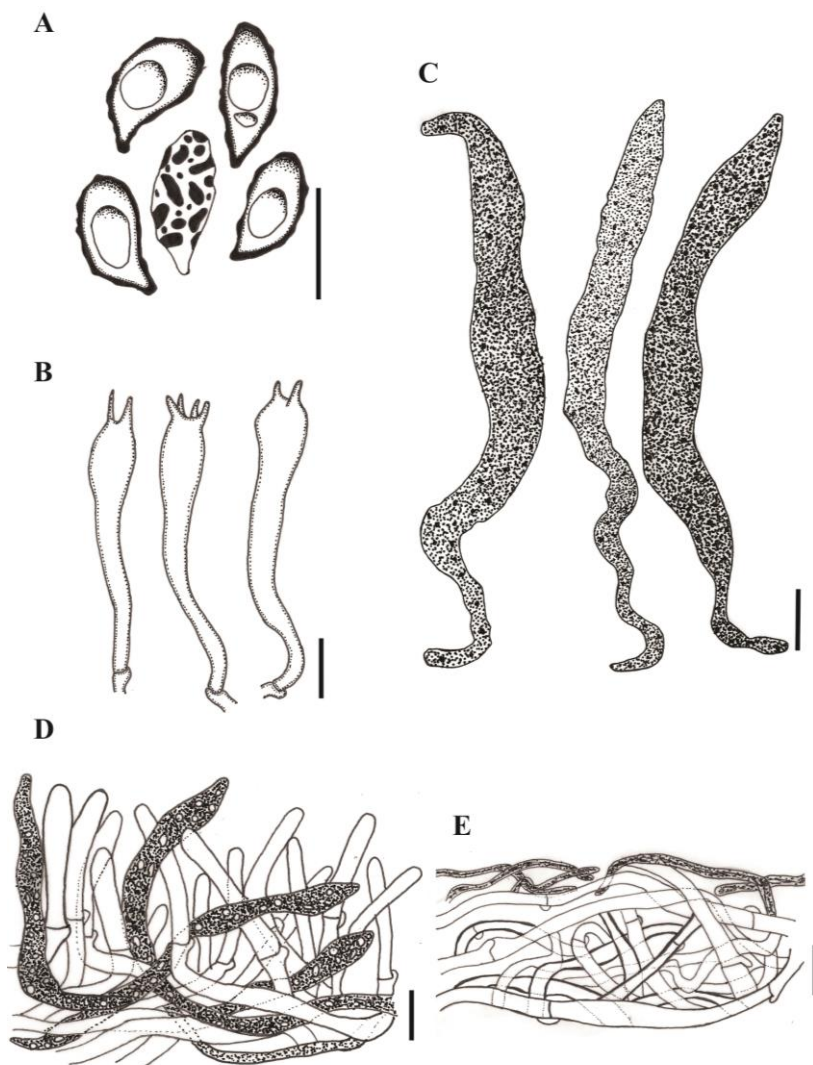


Figura 5. Caracteres micromorfológicos de *Gloeocantharellus cf. corneri*. **A:** Basidiósporos; **B:** Basídios; **C:** Gloeocistídios; **D:** Estipitipellis; **E:** Pileipellis. Escala: 10µm.

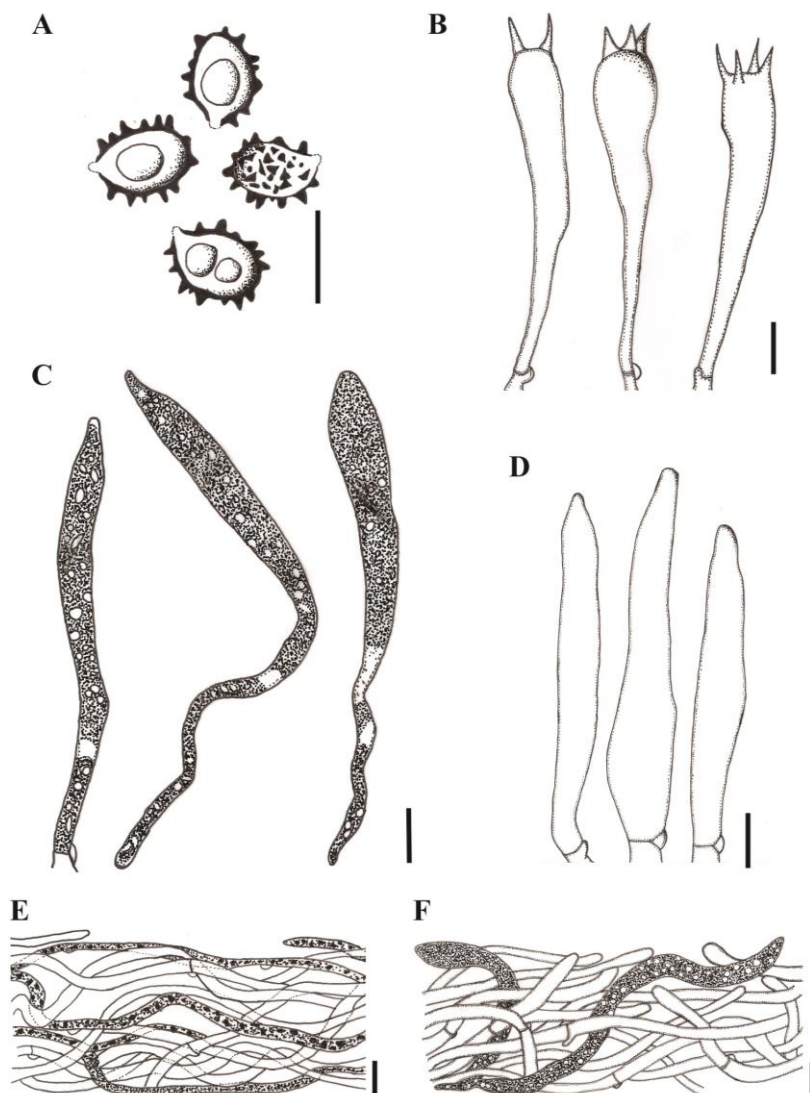


Figura 6. Caracteres micromorfológicos de *Gloeocantharellus* aff. *echinosporus*. **A:** Basidiósporos; **B:** Basídios; **C:** Gloeocistídios; **D:** Cistídios himeniais; **E:** Pileipellis; **F:** Estipitipellis. Escala: 10µm.

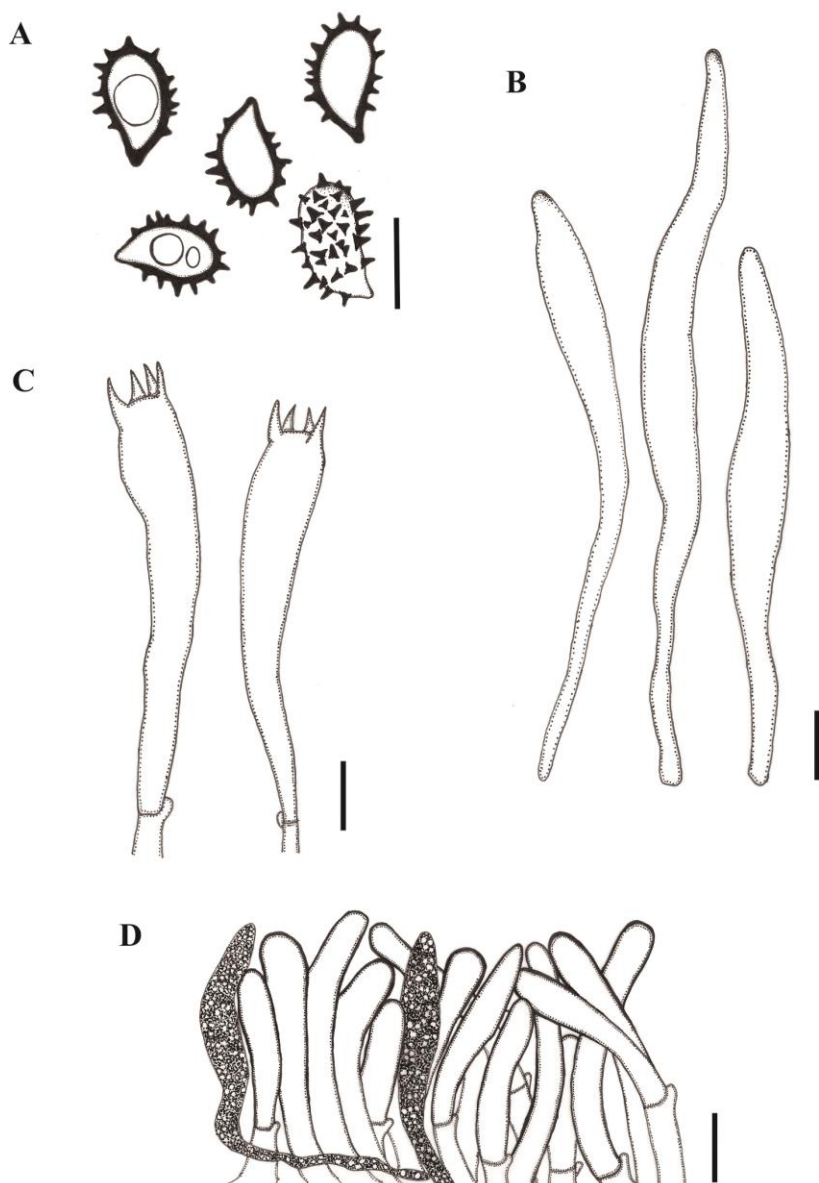


Figura 7. Caracteres micromorfológicos de *Gloeocantharellus* sp. 1. **A:** Basidiósporos; **B:** Cistídios himeniais **C:** Basídios; **D:** Estipitipellis. Escala: 10µm.

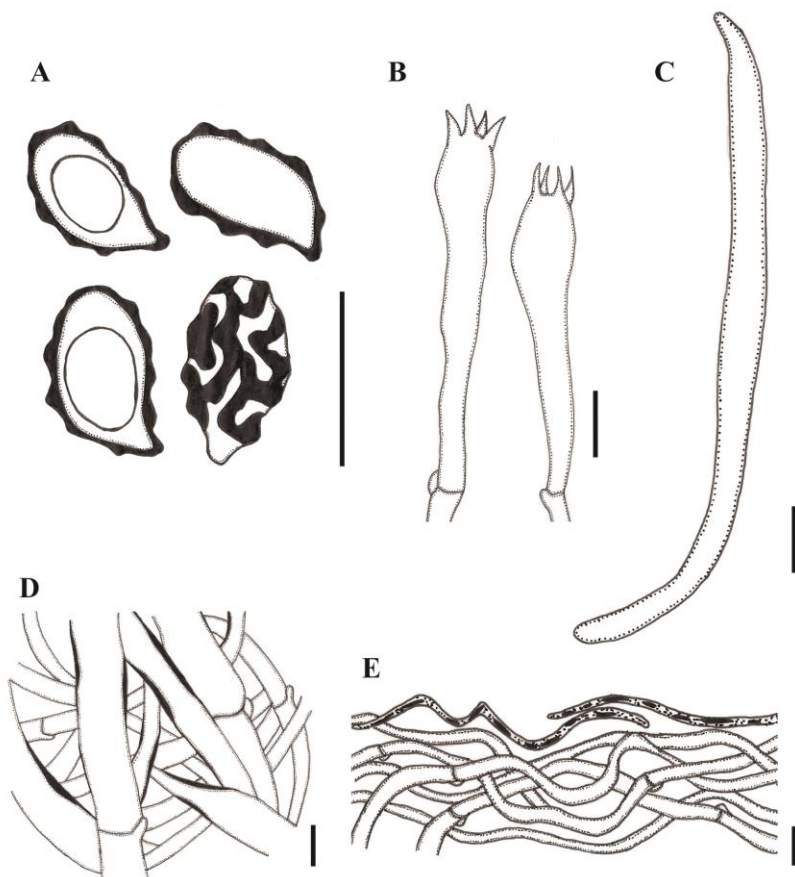
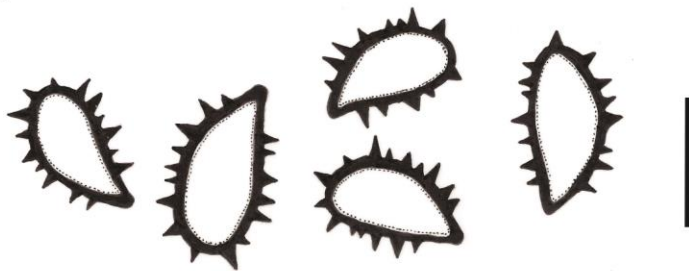
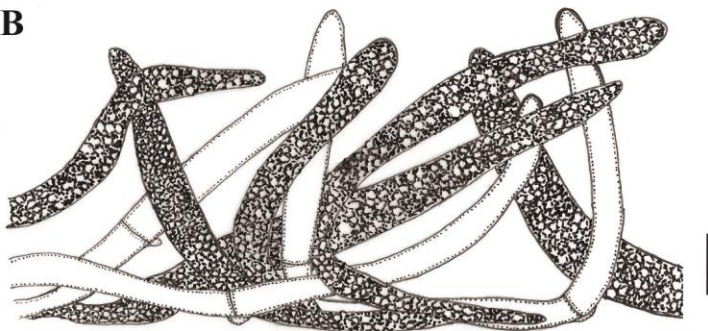


Figura 8. Caracteres micromorfológicos de *Gloeocantharellus* sp. 2. **A:** Basidiósporos; **B:** Basídios; **C:** Cistídio himenial; **D:** Trama do píleo; **E:** Pileipellis. Escala: 10μm.

A



B



C

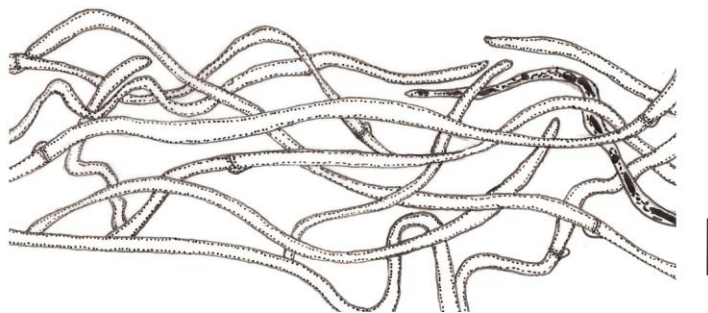


Figura 9. Caracteres micromorfológicos de *Gloeocantharellus echinosporus*. **A:** Basidiósporos; **B:** Estipitipellis; **C:** Pileipellis. Escala: 10µm.

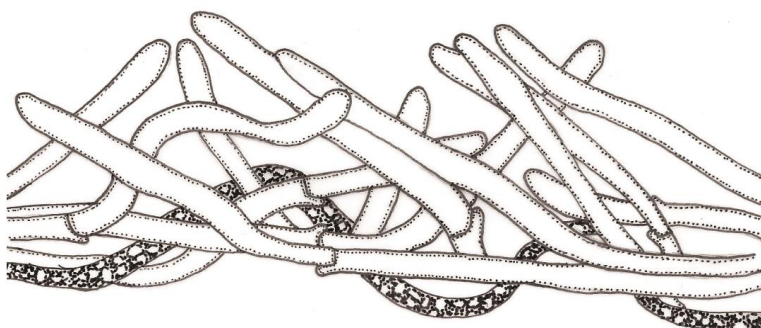
A**B**

Figura 10. Caracteres micromorfológicos de *Gloeocantharellus lateritius*. **A:** Basidiósporos; **B:** Pileipellis. Escala: 10 μ m.

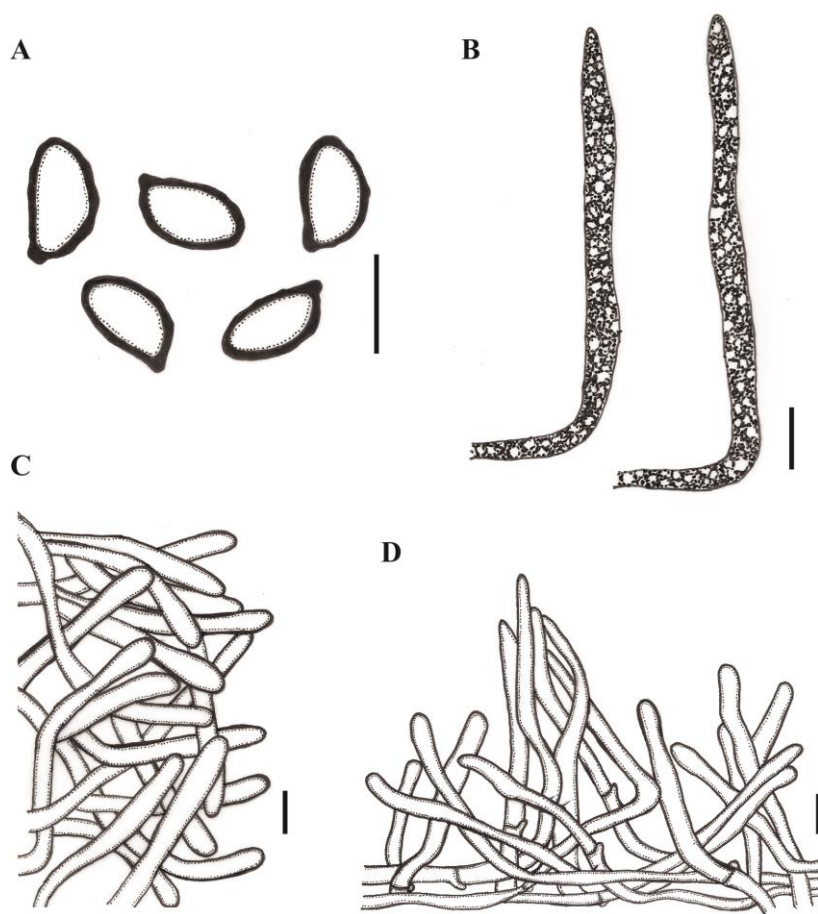


Figura 11. Caracteres micromorfológicos de *Gloeocantharellus okapaensis*. **A:** Basidiósporos; **B:** Gloeocistidios; **C:** Pileipellis; **D:** Estipitipellis. Escala: 10μm.

4.3 DISCUSSÃO GERAL

A árvore filogenética gerada a partir do marcador *atp6* indica *Gloeocantharellus* como um gênero monofilético, formando um clado com todas as espécies do gênero incluídas no estudo. Esta topologia corrobora com o estudo de Giachini *et al.* (2010), os quais alegam ainda que o grupo *Gomphus* s.l. forma uma linhagem parafilética dentro de Gomphaceae.

Gloeocantharellus pallidus e *G. novae-zelandiae* formaram dois ramos distantes das outras espécies do gênero, corroborando com os estudos filogenéticos de Giachini *et al.* (2010). Estas espécies possuem algumas características morfológicas incomuns no gênero. *Gloeocantharellus pallidus* é registrada para o Japão e a combinação do himenóforo enrugado (sem lamelas verdadeiras), ausência de gloeocistídios e ausência de fíbulas separa esta das outras espécies de *Gloeocantharellus*. *Gloeocantharellus novae-zelandiae* é registrada para a Nova Zelândia e é a única espécie do gênero que apresenta himenóforo liso (Giachini 2004).

A sequência de *G. purpurascens* obtida neste trabalho agrupou, com alto valor de suporte em ambas as árvores, com as outras sequências da espécie obtidas no GenBank. O espécime em questão foi coletado no EUA e doado ao herbário HUA, pelo qual tivemos acesso. Contudo, não foi possível revisar morfológicamente o material, fazendo com que não tenhamos dados suficientes para discutir mais a fundo a sua morfologia. Assim sendo, *a priori* os espécimes deste clado foram considerados a mesma espécie. *Gloeocantharellus purpurascens* é a espécie-tipo do gênero e tem distribuição conhecida para os EUA e para o México (Smith & Hesler 1943; Villegas *et al.* 2013), sendo a única espécie de *Gloeocantharellus* registrada para os EUA.

No mesmo filograma é possível observar que o grupo-irmão do clado de *G. purpurascens* é formado por duas espécies: *G. okapaensis* e *Gloeocantharellus* sp. (OSC122875). Estas apresentam ramos longos, o que evidencia a distância filogenética entre elas. *Gloeocantharellus* sp. não apresenta uma descrição morfológica, impossibilitando a sua identificação a nível de espécie. É possível que tais espécies tenham se agrupado devido a baixa amostragem do clado de *Gloeocantharellus*. A proximidade filogenética de *G. okapaensis* e *G. purpurascens* não era esperada, pois são espécies bastante distintas morfológicamente e apresentam uma distribuição disjunta, sendo a primeira registrada para a Oceania e a segunda para a América do Norte. *Gloeocantharellus*

purpurascens possui esporos mais delgados e com ornamentação mais conspicua que em *G. okapaensis*, bem como possui o píleo liso, estipe liso a fibriloso e abundância de gloeocistídios na pileipellis e estipitipellis. Desta forma, é necessário a obtenção de sequências de DNA dos outros espécimes de *G. okapaensis*, de modo a aumentar a amostragem da espécie na filogenia e melhor compreender a sua relação com as outras espécies do gênero.

Gloeocantharellus papuanus Giachini, Bougher, Castellano et Trappe nom. nud. foi descrita por Giachini (2004), a partir de uma coleta de Papua Nova Guiné, porém a proposição da espécie não foi validamente publicada. No trabalho, o autor afirma que esta espécie assemelha-se morfologicamente a *G. novae-zelandiae* e *G. dingleyae*. A espécie, no filograma de *atp6*, apresentou uma divergência na sua localização dentro do clado de *Gloeocantharellus* entre as duas análises realizadas. Todavia, no filograma gerado por Inferência Bayesiana a posição de *G. papuanus* apresentou um maior valor de suporte no ramo basal. Ainda, em ambas as análises, *G. papuanus* está filogeneticamente mais relacionada a outras espécies do gênero do que a *G. novae-zelandiae*, espécie com morfologia similar, segundo Giachini (2004).

A topologia de ambas as árvores filogenéticas indica que os espécimes coletados neste trabalho estão bem delimitados num clado, juntamente com *G. echinosporus*. Exceto por *G. echinosporus*, esta topologia isola os táxons com distribuição neotropical dos outros, que são registrados para outras regiões fitogeográficas (boreal e paleotropical).

Os espécimes coletados neste trabalho agruparam-se em dois clados em ambos os filogramas, com alto valor de suporte. O agrupamento dos espécimes ACM 507 e ACM 524 confirma que ambos representam a mesma espécie (*Gloeocantharellus* sp. 1), corroborando com os dados morfológicos. Apesar de nem todas as espécies de *Gloeocantharellus* estarem incluídas neste estudo, a topologia e localização do clado formado por *Gloeocantharellus* sp. 1 em ambas as árvores filogenéticas indicam que provavelmente esta represente uma espécie de *Gloeocantharellus* ainda não descrita para a ciência, como já comentado anteriormente na discussão morfológica do táxon. O clado de *Gloeocantharellus* sp. 1 agrupou-se com *Gloeocantharellus* aff. *echinosporus*, mostrando ainda que são táxons muito relacionados filogeneticamente, representados por ramos bastante curtos em ambos os filogramas. Contudo, apesar de ambas possuírem esporos tuberculados, apresentam outras características morfológicas distintas.

Gloeocantharellus sp. 1 possui o basidioma alaranjado e menos robusto, o píleo menor, hifas do contexto com a parede bastante engrossada em alguns locais e a estípiteipellis tricolorada paliçada. Estas duas espécies são as únicas do gênero que possuem esporos com ornamentação tuberculada relatadas até o momento, fazendo com que este carácter ganhe peso taxonômico e corrobore a proximidade filogenética apresentada nos filogramas. Outras semelhanças morfológicas são observadas entre os dois táxons, como a pileipellis gelatinizada e esporos com tamanhos similares. Em suma, apesar destes dois táxons apresentarem algumas diferenças morfológicas, o resultado das análises moleculares para os marcadores em questão não foi congruente com os dados morfológicos, indicando que ambos possivelmente representam a mesma espécie. É possível que a inclusão de outros marcadores moleculares, aumento da amostragem e/ou inclusão de novos táxons na filogenia auxiliem nesta delimitação.

Em ambas as análises, *Gloeocantharellus* aff. *echinosporus* ficou filogeneticamente pouco relacionada com *G. echinosporus*, indicando que não representam a mesma espécie, corroborando com os dados morfológicos discutidos anteriormente. Ainda assim, *G. echinosporus* formou um clado mais próximo dos táxons brasileiros do que das outras espécies de *Gloeocantharellus*, contudo ainda não há evidências que ajudem a esclarecer esta relação, visto que estes táxons estão separados por barreiras oceânicas.

É possível observar entre os espécimes de *G. echinosporus*, no filograma de *atp6*, diferenças moleculares intraespecíficas significativas. Quando comparados com as diferenças moleculares existentes entre materiais de uma mesma espécie ou até entre diferentes espécies do gênero, neste filograma, estes materiais poderiam ser considerados espécies distintas. Os mesmos foram revisados e, apesar de serem morfológicamente muito similares, foram coletados em ilhas diferentes, o que reforça a hipótese de espécies crípticas.

Um segundo clado dos materiais brasileiros foi formado por *Gloeocantharellus* cf. *corneri* e *Gloeocantharellus* sp. 2. Estes táxons possuem poucas semelhanças morfológicas, mas são muito relacionados filogeneticamente, como mostram os filogramas. Macromorfológicamente, ambos possuem diferenças na coloração e tamanho do basidioma e na superfície do píleo, sendo que *Gloeocantharellus* sp. 2 possui basidiomas de pequeno porte e cor forte vermelha, e a superfície da margem do píleo fibrilosa. Ainda, a micromorfologia também é distinta, com esporos menores e

ornamentação reticulada, basídios maiores, presença de cistídios hialinos e pileipellis gelatinizada em *Gloeocantharellus* sp. 2. Apesar de serem muito relacionados filogeneticamente, é pouco provável que estes espécimes representem a mesma espécie, devido a ampla variação morfológica entre eles, principalmente com relação à ornamentação dos esporos. Ambos são representados nos filogramas por apenas um espécime cada, o que poria à prova nossa hipótese inicial discutida anteriormente, contudo o conjunto de dados morfológicos é suficiente para a separação dos táxons. Uma maior amostragem e a inclusão de novos marcadores na filogenia poderão corroborar a hipótese de dois táxons.

Um caso interessante ocorreu com os exemplares ACM 507 e ACM 508, coletados na mesma localidade e data, os quais foram discutidos detalhadamente anteriormente (pg. 46 e 49). O tipo de ornamentação dos esporos foi o principal caracter distinguível entre estes dois táxons, que apresentam muitas semelhanças macro e micromorfológicas. Ainda assim, dados moleculares apontam uma distância filogenética considerável entre eles, demonstrando ainda a proximidade de ACM 507 com *G. aff. echinosporus*, bem como de ACM 508 com *G. cf. corneri*. Esta topologia reforça o peso taxonômico do caracter ornamentação do esporo dentro do gênero, visto que os dois primeiros apresentam um padrão de ornamentação com cristas bem pronunciadas e os dois últimos um padrão mais verrucoso a reticulado.

Em suma, os resultados das análises filogenéticas com relação aos ramos terminais dos espécimes coletados neste trabalho não foram congruentes com os dados morfológicos destes, discutidos anteriormente, de modo que a filogenia indica duas espécies ao invés de quatro. Assim, conclui-se que, ou os marcadores moleculares utilizados não são favoráveis na delimitação de espécies para este grupo, ou os táxons em questão representam duas espécies, uma para cada clado mais inclusivo formado, porém com uma variação morfológica intraespecífica, mais sutil em *Gloeocantharellus* sp. 1 e *G. aff. echinosporus*, e bem mais expressiva em *Gloeocantharellus* sp. 2 e *G. cf. corneri*.

Quanto ao isótipo de *G. lateritius* analisado morfológicamente neste trabalho, não foi possível incluí-lo na análise molecular, pois o herbário K não concedeu a autorização para realizar os procedimentos moleculares com o mesmo e não há sequências da espécie disponíveis no banco de dados.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente, há poucos trabalhos envolvendo espécies de *Gloeocantharellus* e estes, majoritariamente, visam uma maior compreensão da história evolutiva e das relações filogenéticas a nível de ordem. Apesar de serem reconhecidas 11 espécies para o gênero, até o momento não existem trabalhos com enfoque nas relações filogenéticas entre elas, através de uma abordagem morfológica e molecular. Sendo assim, este trabalho é pioneiro neste tipo de estudo e acredito que servirá como base para estudos futuros.

Neste trabalho foram coletados cinco espécimes identificados como *Gloeocantharellus*, dos quais três representam possíveis espécies novas, todos coletados em áreas de Mata Atlântica brasileira, aumentando a diversidade e a distribuição conhecida para o gênero. Estes registros também aumentam a diversidade conhecida para o Brasil, no qual apenas uma espécie é registrada (*G. corneri*). Com isso, são necessárias novas expedições de coletas nas regiões onde foram coletados os espécimes bem como em diferentes localidades, a fim de aumentar a amostragem e possivelmente a distribuição dos táxons encontrados. Acredito que tanto a distribuição quanto a riqueza das espécies de *Gloeocantharellus* no Brasil estão subamostradas e que o estudo continuado em diferentes biomas brasileiros possivelmente revelará novidades científicas.

A partir de análises morfológicas detalhadas, caracteres nunca descritos para o gênero ganham peso taxonômico, como hifídios e o micélio basal. Além disso, a presença de outro tipo de cistídio além dos gloeocistídios também foi observada e deve ser verificada nas outras espécies do gênero. A superfície dos esporos (ornamentação) se mostrou um carácter primordial na delimitação de algumas espécies. Deste modo, ressalto a importância das análises ultraestruturais em MEV em futuras descrições de novos táxons, bem como em revisões de coleções de herbário, visto que a ornamentação dos esporos nem sempre pode ser observada detalhadamente em microscopia de luz. Algumas espécies do gênero são morfológicamente muito similares e este carácter se revelou crucial na distinção entre elas.

A análise filogenética molecular de espécies de *Gloeocantharellus* nos permitiu inferir e discutir algumas relações interespecíficas, não observáveis somente a partir de dados morfológicos e de distribuição. Os filogramas gerados a partir de dois métodos de análise filogenética, da região *atp6* (DNA mitocondrial) e

da região ITS (DNA nuclear), apresentaram topologias similares, o que aumenta a confiabilidade dos resultados. Estes estudos contribuem para esclarecer as relações filogenéticas entre as espécies do gênero. Todavia, é necessário o aumento da amostragem, a inclusão de outros táxons do gênero e de novos marcadores moleculares, assim como a realização de análises combinadas para uma melhor resolução destas relações. Ainda, a obtenção de sequências da região ITS, apesar de incomum em estudos com *Gloeocantharellus*, é importante, visto que esta foi escolhida como a região Barcoding para fungos.

A inclusão de espécimes neotropicais nos estudos é um fator de destaque no presente trabalho, visto que até o momento grande parte dos estudos foram realizados com materiais asiáticos, oceânicos e norte-americanos. Espero com isso, além de ampliar o conhecimento taxonômico e de distribuição do gênero, contribuir com o conhecimento acerca da biodiversidade de fungos no Brasil, especialmente no bioma Mata Atlântica, que é reconhecido mundialmente como um *hots-pot*.

Por fim, novas análises morfológicas de espécimes de *Gloeocantharellus* de vários locais do mundo e a inclusão destas nas análises filogenéticas do gênero serão realizadas num futuro próximo. Os resultados deste trabalho juntamente com as próximas análises serão publicados num artigo científico em parceria com os pesquisadores Pablo Daniels e Egon Horak.

REFERÊNCIAS

- BINDER, M.; HIBBETT, D. 2003. Hibbett lab protocols for DNA isolation, PCR, and DNA sequencing. Disponível em: < <http://www.clarku.edu/faculty/dhibbett/> >
- BLACKWELL, M. 2011. The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species?. *American Journal of Botany*, 98(3): 426-438.
- BULAKH, E.M.; GOVOROVA, O.K. 2000. Rare and new for Russia Basidiomycetes from primorsky territory. *Mycology and Phytopathology*, 34: 21-25.
- CORNER, E.J.H. 1966. A monograph of the cantharelloid fungi. *Annals of Botany Memoir*, 2: 1-255.
- CORNER, E.J.H. 1969. Notes on cantharelloid fungi. *Nova Hedwigia*, 18(2-4): 783-818.
- DARRIBA, D.; TABOADA, G.L.; DOALLO, R.; POSADA, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8): 772.
- DENG, C-Y.; LI, T-H. 2008. *Gloeocantharellus persicinus*, a new species from China. *Mycotaxon*, 106: 449-453.
- DENTINGER, B.T.M.; MARGARITESCU, S.; MONCALVO, J.M. 2010. Rapid and reliable high-throughput methods of DNA extration for use in barcoding and molecular systematics of mushrooms. *Molecular Ecology Resources*, 10: 628-633.
- DONK, M.A. 1961. Four new families of Hymenomycetes. *Persoonia*, 1(4): 405-407.
- DONK, M.A. 1964. A conspectus of the families of Aphyllophorales. *Persoonia*, 3(2): 199-324.
- GIACHINI, A.J. 2004. Systematics, Phylogeny, and Ecology of *Gomphus sensu lato*. Doutorado (Forest Science), Oregon State University, Oregon. 446 pp.

- GIACHINI, A.J.; CASTELLANO, M.A. 2011. A new taxonomic classification for species in *Gomphus* sensu lato. *Mycotaxon*, 115: 183-201.
- GIACHINI, A.J.; HOSAKA, K.; NOUHRA, E.; SPATAFORA, J.; TRAPPE, J.M. 2010. Phylogenetic relationships of the Gomphales based on nuc-25S-rDNA, mit-12S-rDNA, and mit-*atp6*-DNA combined sequences. *Fungal Biology*, 114: 224-234.
- GONZÁLEZ-ÁVILA, P.A.; LUNA-VEGA, I.; RÍOS, M.V.; SAADE, R.L.; BLANCO, J.C. Current knowledge and importance of the order Gomphales (Fungi: Basidiomycota) in Mexico. 2013. *Nova Hedwigia*, 97(1-2): 55-86.
- GUINDON, S.; GASCUEL, O. 2003. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology*, 52: 696-704.
- HAWKSWORTH, D.L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, 105(12): 1422-1432.
- HAWKSWORTH, D.L. 2006. Pandora's Mycological Box: Molecular sequences vs. morphology in understanding fungal relationships and biodiversity. *Revista Iberoamericana de Micología*, 23: 127-133.
- HAWKSWORTH, D.L.; ROSSMAN, A.Y. Where Are All the Undescribed Fungi?. 1997. *Phytopathology*, 87: 888-891.
- HIBBETT, D.S. 2004. Trends in Morphological Evolution in Homobasidiomycetes Inferred Using Maximum Likelihood: A Comparison of Binary and Multistate Approaches. *Systematic Biology*, 53(6): 889-903.
- HIBBETT, D.S.; BAUER, R.; BINDER, M.; GIACHINI, A.J.; HOSAKA, K.; JUSTO, A.; LARSSON, E.; LARSSON, K.H.; LAWREY, J.D.; MIETTINEN, O.; NAGY, L.G.; NILSSON, R.H.; WEISS, M.; THORN, R.G. 2014. Agaricomycetes. *The Mycota*, Systematics and Evolution, 2nd ed., 7A: 373-429.

HOSAKA, K.; BATES, S.T.; BEEVER, R.E.; CASTELLANO, M.A.; COLGAN, W.; DOMÍNGUEZ, L.S.; NOUHRA, E.R.; GEMML, J.; GIACHINI, A.J.; KENNEY, S.R.; SIMPSON, N.B.; SPATAFORA, J.W.; TRAPPE, J.M. 2006. Molecular phylogenetics of the gomphoid-phalloid fungi with an establishment of the new subclass Phallomycetidae and two new orders. *Mycologia*, 98(6): 949-959.

JOSEPH, A.V.; MANIMOHAN, P. 1998. Rediscovery of two rare agaricoid basidiomycetes. *Mycological Research*, 102(4): 476-478.

JÜLICH, W. 1981. Higher taxa of Basidiomycetes. *Bibliotheca Mycologica*, 85: 1-485.

KATOH, K.; STANDLEY, D.M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 772-780.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MENTJIES, P.; DRUMMOND, A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12): 1647-1649.

KIRK, P.M.; CANNON, P.F.; MINTER, D.W.; STALPERS, J.A. 2008. Dictionary of the Fungi. 10th ed. CABI, Wallingford, UK, 771 pp.

KRAMER, L.A. 2004. The online auction color chart. Online Auction Color Chart Company, Stanford.

KRETZER, A.M.; BRUNS, T.D. 1999. Use of *atp6* in Fungal Phylogenetics: An Example from the Boletales. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 13(3): 483-492.

LARGENT, D.L. 1986. How to Identify Mushrooms to Genus I: Macroscopic Features. 2^a ed. Mad River Press Inc., Eureka, 166 pp.

- LARGENT, L.A.; JOHNSON, D.; WATLING, R. 1977. How to identify mushrooms to genus III: microscopic features. 3^a ed. Mad River Press Inc., Eureka.
- LARSEN, M.J.; BURDSALL, H.H. 1976. A consideration of the term gloeocystidium. *Memoirs of the New York Botanical Garden*, 28(1): 123-130.
- LLOYD, C.G. 1917. Index of the Mycological Writings of C.G. Lloyd. *Mycological Notes*, 47: 654-668.
- MUELLER, G.M.; SCHMIT, J.P. 2007. Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict?. *Biodiversity and Conservation*, 16: 1-5.
- PEAY, K.G.; KENNEDY, P.G.; BRUNS, T.D. 2008. Fungal Community Ecology: A Hybrid Beast with a Molecular Master. *BioScience*, 58(9): 799-810.
- PEGLER, D.N. 1986. Agaric flora of Sri Lanka. *Kew Bulletin Additional Series*, 12: 1-519.
- PETERSEN, R.H. 1968. Notes on cantharelloid fungi I. Gomphus S. F. Gray and some clues to the origin of ramarioid fungi. *J. Elisha Mitchell Scientific Society*, 84: 373-381.
- PETCH, T. 1917. Additions to Ceylon Fungi. *Annals of the Royal Botanic Gardens of Peradeniya*, 6(3): 195-256.
- PINE, E.M.; HIBBETT, D.S.; DONOGHUE, M.J. 1999. Phylogenetic relationships of cantharelloid and clavarioid Homobasidiomycetes based on mitochondrial and nuclear rDNA sequences. *Mycologia*, 91(6): 944-963.
- ROMANO, E.; BRASILEIRO, A.C.M. 1998. Extração de DNA de plantas. *Bioteecnologia: Ciência & Desenvolvimento*, 2(9): 40-43.
- SEGEDIN, B.P. 1984. Two new species of *Gomphus* Pers. (Aphylllophorales) from New Zealand. *New Zealand Journal of Botany*, 22(4): 533-537.

- SINGER, R. 1945. New genera of fungi-II. *Lloydia*, 8(3): 140.
- SINGER, R. 1947. Coscinoids and coscinocystidia in *Linderomyces lateritius*. *Farlowia*, 3(2): 155-157.
- SINGER, R. 1961. Two genera of fungi new for South America. *Vellozia*, 1: 14.
- SINGER, R.; ARAUJO, I.; IVORY, M.H. 1983. The Ectotrophically Mycorrhizal Fungi of the Neotropical Lowlands, Especially Central Amazonia. *Beihefte Zur Nova Hedwigia*, 77: 17.
- SMITH, A.H.; HESLER, L.R. 1943. New and interesting Agarics from Tennessee and North Carolina. *Lloydia*, 6(4): 248-266.
- STAMATAKIS, A. 2014. RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies. *Bioinformatics*.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.
- THIERS, B. (atualizado continuamente). Index Herbariorum: a global directory of public herbaria and associated staff. *New York Botanical Garden's Virtual Herbarium*. Disponível em: < <http://sweetgum.nybg.org/ih/> >
- VASCO-PALACIOS, A.M.; FRANCO-MOLANO, A.E. 2005. A new species of *Gloeocantharellus* (Fungi-Basidiomycetes) from Colombian Amazonia. *Mycotaxon*, 91: 87-92.
- VILLEGAS, M.; CIFUENTES, J.; ESTRADA-TORRES, A.; KONG, A. 2010. The genus *Gomphus* in tropical and subtropical zones of Mexico. *Nova Hedwigia*, 90(3-4): 491-501.
- VILLEGAS, M.; DE LUNA, E.; CIFUENTES, J.; TORRES, A.E. 1999. Phylogenetic studies in Gomphaceae sensu lato (Basidiomycetes). *Mycotaxon*, 70: 127-147.

WATLING, R.; DE MEIJER, A.R. 1997. Macromycetes from the state of Paraná, Brazil. *Edinburgh Journal of Botany*, 54 (2): 231-251.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.D.; LEE, S.; TAYLOR, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Em: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.; WHITE, T.J. (eds), PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. *Academic Press*, San Diego, pp. 315-322.

ANEXO A – Isolamento de DNA total de plantas utilizando-se o método CTAB de Romano & Brasileiro (1998) adaptado para fungos

1. Cortar um pequeno pedaço do basidioma (aprox. 15 mg) e o transferir para um almofariz contendo nitrogênio líquido. Com o auxílio de um pilão, pulverize o material até se obter um pó fino.
2. Transfira o pó obtido para um *ependorf* de 2 mL que contenha 750 µL de tampão CTAB* pré-aquecido a 65°C. Feche o tubo e misture gentilmente até o pó ficar homogeneamente distribuído.
3. Adicione 4 µL de β-mercaptoetanol. Recomenda-se que esta etapa seja feita na capela devido à toxicidade do reagente.
4. Incube as amostras em banho-maria a 60°C por 30 min, agitando ocasionalmente o tubo para manter o extrato ressuspensionado.
5. Retire o tubo do banho-maria e espere que a mistura atinja a temperatura ambiente. Adicione 750 µL de clorofórmio:álcool isoamílico gelado (24:1; v/v). Feche o tubo e misture manualmente por 10 min. Recomenda-se que esta etapa seja feita na capela devido à toxicidade do reagente.
6. Centrifugue a 14.000 rpm por 10 min à temperatura ambiente, para separar a fase orgânica da aquosa.
7. Transfira a fase aquosa (fase superior) para um tubo novo de 1,5 mL e descarte o *ependorf* antigo. Evite pegar qualquer proteína desnaturada presente na interface. Recomenda-se retirar 150 µL por vez.
8. Repita a extração com clorofórmio:álcool isoamílico mais uma ou duas vezes (etapas de 5 a 7), levando em consideração que mais extrações podem tornar a amostra mais pura, porém com maiores perdas de DNA.
9. Adicione 450 µL de isopropanol a -20°C. Misture suavemente até formar um precipitado. Deixar a -20°C por pelo menos 1 h.
10. Centrifugue a amostra a 10.000 rpm por 20 min. Em uma boa preparação, o DNA não deve estar escuro.
11. Descarte o sobrenadante e lave o precipitado com 450 µL de etanol 70% (v/v).
12. Centrifugue novamente a 14.000 rpm por 3 min.
13. Descarte o sobrenadante e seque o precipitado pela borda do *ependorf*. Coloque o tubo em banho-maria seco a 35°C até secar totalmente.

14. Dissolva o precipitado em 50 μL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) e incube a 4°C (geladeira) por meia hora ou mais. A amostra pode ser então armazenada a -20°C (freezer).

***Tampão CTAB**

CTAB 2% (p/v)

NaCl 1,4 M

Tris-HCl 100 mM pH 8,0

EDTA 20 mM

ANEXO B – Protocolo de Extração utilizando o kit DNA Magnex (adaptado do original)

1. Pesar em um *ependorf* de 1,5 mL aproximadamente 0,15–0,80 mg do material a ser extraído;
(Atenção: não utilizar grandes quantidades de material, pois o rendimento pode ser baixo)
2. Macerar a amostra utilizando nitrogênio líquido e um macerador de *ependorf*;
3. Adicionar 270 μL de Tampão de Lise e 2 μL de Proteinase K;
4. Incubar a 56°C por 1 h;
5. Adicionar 100 μL do Tampão de Extração e homogeneizar em vórtex;
6. Adicionar 10 μL de resina magnética, homogeneizar em vórtex e incubar a 56°C por 5 min;
7. Homogeneizar em vórtex novamente e colocar o tubo na estante magnética. Aguardar 1 min e, então, aspirar o líquido com pipeta e descartar;
8. Adicionar 100 μL do Tampão de Lavagem de uso e homogeneizar em vórtex;
9. Colocar o tubo na estante magnética, aguardar 1 min, aspirar cuidadosamente o líquido com a pipeta e descartar;
10. Repetir as etapas 8 e 9 duas vezes;
11. Deixar o tubo em repouso, com a tampa aberta, durante 15 min em temperatura ambiente ou até que todo álcool tenha evaporado;
12. Adicionar 50 μL do Tampão de Eluição, homogeneizar em vórtex e incubar a 70°C por 15 min.
13. Homogeneizar em vórtex por alguns segundos e colocar o tubo na estante magnética. Aguardar 1 min. Transferir cuidadosamente o líquido contendo o DNA para um novo tubo já identificado.

ANEXO C – Protocolo de purificação do produto de PCR com PEG

1. Adicionar igual volume de PEG 20% e misturar bem, por *up-and-down*.
2. Incubar em banho-maria a 37°C por 30 min.
3. Centrifugar por 15 min a 12000–13000 rpm.
4. Retirar o máximo possível de sobrenadante com uma pipeta, com cuidado para não encostar a ponteira no fundo do tubo. O pellet é muito pequeno e às vezes não pode ser visto, por isso deve evitar tocar no fundo e nas paredes laterais.
5. Adicionar 125 µL de etanol 80% gelado e centrifugar por 5 min a 12000–13000 rpm.
6. Retirar o máximo possível de sobrenadante, revertendo o tubo e secar a borda dos tubos com papel absorvente.
7. Repetir os passos 5 e 6.
8. Deixar os tubos abertos para secar à temperatura ambiente ou em banho-maria a 45°C até que não haja vestígios de etanol.
9. Ressuspender em água Milli-Q aproximadamente a mesma quantidade que o volume inicial, ou menos para aumentar a concentração de DNA (Ex: 15 µL).
10. Colocar em banho-maria a 45°C por 30 min.